

*Universidad Autónoma de Madrid*

*Departamento de Bioquímica*

**TOLERANCIA A ENDOTOXINAS: UNA  
EXPLICACIÓN A LAS INFECCIONES  
RECURRENTES EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA  
CRÓNICA.**

*TESIS DOCTORAL*

*M<sup>a</sup> TERESA JURADO CAMINO*

*Madrid, 2015*



*Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid*

**TOLERANCIA A ENDOTOXINAS: UNA  
EXPLICACIÓN A LAS INFECCIONES  
RECURRENTES EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA  
CRÓNICA.**

*Memoria presentada por M<sup>a</sup> Teresa Jurado Camino para  
optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad  
Autónoma de Madrid*

*Directores de tesis:*

*Dr. Eduardo López Collazo*

*Dra. Carolina Cubillos Zapata*

*Instituto de Investigación Sanitaria, IdiPaz  
Hospital Universitario de la Paz  
Madrid 2015*



*A María, la luz de mi vida*



## *AGRADECIMIENTOS*

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Eduardo López Collazo y a la Dra. Carolina Cubillos Zapata, directores de esta Tesis, el haberme dado la oportunidad de trabajar con vosotros, la confianza depositada en mí y la ayuda en el desarrollo de este trabajo.

También quiero mostrar mi agradecimiento a Dr. Raúl Córdoba, hematólogo del Hospital Infanta Sofía, por su colaboración en el reclutamiento y en la clasificación de los pacientes utilizados en este estudio.

A todos mis compañeros del laboratorio Ale, Víctor, Enrique y Aurora. Ha sido los mejores compañeros que podía tener, siempre me han prestado su ayuda cuando la he necesitado. Espero haberos correspondido. Quiero agradecer muy especialmente a Aurora su enorme trabajo con las cuantitativas sin su ayuda no habría llegado a tiempo.

También quiero agradecer a todos los compañeros que han pasado por la Unidad. Con ellos he compartido muchos ratos en cultivos, en el citómetro y en el cuartito del café, y con ellos he compartido buenos y malos momentos. Pero siempre me han echado una mano. Gracias a Luiz, Lupe, Vane, Virginia, Arancha, Miguel, Belén, Irene, Yolanda, gracias a los chicos de neuro, María Berta, Jaime. Gracias a Gema y Ana por toda la ayuda que siempre me han prestado en cultivos, a Alicia, Pachi, Lara. Gracias a Maite, Rosa, Carolina, Luz, y Susana. Gracias a todos por los muchos ratos compartidos, por las cenas, los karaokes....Espero no haberme dejado a nadie.

A Irene, Vane y María, por su amistad, porque ellas han hecho agradable el día a día, por hacer que esas tarde largas de estímulos y buffys se llenaran de buen humor y no fueran pesadas. Por todos los momentos vividos, sin duda vuestra amistad es lo mejor que me llevo de esta etapa. No sé si algún día podré agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí.

Quiero dar las gracias a mis nuevos compañeros del servicio de inmunología en La Paz, ellos me han acompañado y animado en el largo camino de la escritura, siempre que he necesitado algo han estado ahí, gracias a Pili, Fer, Alberto, Juan, Lucía, María B, María C, Alejandro, Bea, y Yadira.

También quiero agradecer de forma muy especial a mis compañeros de auto II, a Cristina, Susana y M<sup>a</sup> Jesús por acogerme con los brazos abiertos. Quiero dar las gracias a Alejandro y a Chami por enseñarme tanto cada día y por confiarme trabajos tan interesantes. A Ana solo le puedo dar las gracias por ser la mejor compañera que podría tener además de mi amiga. Y por último a Dora, que me acogió en su laboratorio hace ya dos años y ni un solo día ha dejado de

enseñarme cosas valiosas en ciencia y en la vida, nunca tendré palabras para agradecerte todo lo que has hecho para que hoy esta tesis sea posible, nunca has dejado que me rindiera y siempre me has animado, gracias, gracias de corazón.

Esta Tesis también tiene un trocito de mis padres, de mi hermana y de mi sobrino, que siempre me han apoyado en todo, y aunque muchas veces no entiendan ni de que hablo siempre se sienten orgullosos de mi trabajo. Gracias por ese apoyo incondicional.

Y sobre todo quiero agradecer de una manera muy especial a Iván todo el esfuerzo que ha supuesto para el esta Tesis, siempre has estado a mi lado y me has animado con todo. Esta Tesis también te pertenece porque has participado en todas las etapas. Gracias por comprenderme, por cuidarme y por estar a mi lado en todo momento. Siento mucho todo el tiempo que os robado, a ti y a María, espero ser capaz de compensároslos algún día.



## RESUMEN EN CASTELLANO

Las infecciones son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con Leucemia Linfática Crónica (LLC). La patogénesis de las infecciones es multifactorial, incluyendo entre las causas principalmente descritas, la hipogammaglobulinemia y la inmunosupresión generada en ellos debido a las terapias administradas. Sin embargo, pacientes sin estos factores de riesgo desarrollan de igual forma infecciones y aún no están claros los mecanismos implicados. En el presente trabajo se demuestra que la respuesta inflamatoria de los monocitos ( $M\phi$ ) de 70 pacientes con LLC se encuentra bloqueada en un estado refractario y que son incapaces de desarrollar una respuesta inflamatoria clásica frente a una endotoxina, como es el LPS, pudiendo ser la causa en el incremento de infecciones que presentan estos pacientes. Además, comprobamos como los  $M\phi$  presentan características de la “tolerancia a endotoxinas” entre las que se incluyen la baja producción de citoquinas pro-inflamatorias; alta expresión de los marcadores de membrana CD16, CD163 y CD64; alta capacidad fagocítica; disminución tanto en la expresión de las moléculas del complejo de histocompatibilidad HLA-DQ y HLA-DR como en la capacidad para la presentación antigénica. Además se vio significativamente incrementado el principal regulador negativo de la vía TLR4, IRAK-M.

Por otra parte, se ha encontrado una importante asociación entre el incremento de la tasa de infecciones en los pacientes con LLC y altas concentraciones de ácido hialurónico (HA). Sin embargo, no se ha encontrado una implicación directa de esta molécula en la generación de un fenotipo tolerante en los  $M\phi$  y tampoco de ningún otro factor soluble analizado. Sólo el contacto directo de los  $M\phi$  con las células tumorales es capaz de reproducir *in vitro* las características fenotípicas observadas en los pacientes con LLC. Con el objeto de validar todas estas características y ampliar los estudios al respecto se desarrolló un modelo *in vitro* de  $M\phi$  de “buffy coat” co-cultivados con células tumorales de LLC, (MEC-1) emulando así las características de los pacientes con LLC.

Además, en el presente trabajo se encontró una significativa sobre-expresión del miRNA146a tanto en los  $M\phi$  del modelo como en los  $M\phi$  de los pacientes con LLC. Los genes dianas de este miRNA IRAK-1 y TRAF6 se encontraron significativamente disminuidos.

Concluyendo, en la presente tesis doctoral se aporta una nueva explicación en el estudio de las infecciones en los pacientes con LLC describiendo un nuevo mecanismo de “tolerancia cruzada” existente entre las endotoxinas y los tumores.

## RESUMEN EN INGLÉS

Infections are the most important cause of morbidity and mortality in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). The pathogenesis of infections is multifactorial and includes hypogammaglobulinemia together with specific immunosuppression generated by the different therapies administered. Patients without these risk factors also suffer infections, being the mechanism unknown. In a cohort of 70 patients with CLL, we demonstrated that their monocytes (M $\phi$ ) were locked into a refractory state and were unable to develop a classic inflammatory response to endotoxin, such as LPS. In addition, they exhibited the primary features of endotoxin tolerance (ET), including low cytokine production, high expression of ET markers such as CD16, CD163 and CD64, high phagocytic activity, an impaired expression of two molecules of class II from Complex Major Histocompatibility (HLA-DQ and HLA-DR) and a defective antigen presentation. Further, a significant induction of the main negative regulator of TLR4 pathway, IRAK-M was observed.

On the other hand, a significant association was found between acid hyaluronic (AH) and the increase of rate infections. However, it was not found any implication between this molecule and the generation of tolerant phenotype in monocytes, and neither other soluble factor analyzed.

We have demonstrated that only with the direct contact tumor cell-M $\phi$  is able to generate *in vitro* the phenotype observed in the monocytes of LCC patients. In addition, to validate all these features and in order to expand the studies, an *in vitro* model was developed with M $\phi$  from buffy coat co-cultured with tumor line of LLC (MEC-1) with the aim to simulate the characteristics of patients with LLC.

In other level of the study it was found a significant over-expression of miRNA146a in M $\phi$  co-cultured with cell MEC-1 and M $\phi$  from LLC patients. Moreover the main gene target of this miRNA, such as IRAK-1 and TRAF6 were significant downregulated.

Our study provides a new explanation for infections in patients with CLL and describes a crosstolerance mechanism between endotoxins and tumors.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>- 3 -</b>
1.1 LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B.....	- 5 -
1.1.1. Características clínicas. ....	- 7 -
1.1.2. Papel del sistema inmune en la Leucemia Linfática Crónica. ....	- 8 -
1.2 EL SISTEMA INMUNE INNATO .....	- 9 -
1.2.1. Monocitos y macrófagos. ....	- 10 -
1.2.2. Polarización M1/M2 y sus características. ....	- 11 -
1.2.3. Macrófagos asociados a tumor.....	- 12 -
1.2.4. Receptores tipo Toll (TLRs) .....	- 14 -
1.2.5. Señalización asociada a TLR4.....	- 15 -
1.3 TOLERANCIA A ENDOTOXINAS.....	- 16 -
1.3.1. Implicaciones clínicas de la tolerancia. ....	- 18 -
1.3.2. Fenómenos de tolerancia cruzada. ....	- 19 -
1.4 LOS miRNAs EN EL SISTEMA INMUNE. ....	- 20 -
1.4.1. Biogénesis de los miRNAs.....	- 20 -
1.4.2. El papel de los miRNAs en el desarrollo del sistema inmune. ....	- 21 -
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>- 27 -</b>
3.1 REACTIVOS .....	- 29 -
3.2 PACIENTES .....	- 29 -
3.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA. ....	- 30 -
3.4 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO. ....	- 31 -
3.4.1. Análisis intracelular de citoquinas por citometría de flujo.....	- 31 -
3.5 LÍNEAS CELULARES USADAS. ....	- 31 -
3.6 CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA). ....	- 32 -
3.7 ENSAYOS DE ELISA.....	- 32 -
3.8 TRATAMIENTOS. ....	- 33 -
3.9 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN. ....	- 34 -
3.10 ENSAYOS DE FAGOCITOSIS.....	- 35 -
3.11 AISLAMIENTO DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.....	- 35 -
3.12 PCR A TIEMPO REAL. ....	- 35 -
3.13 AISLAMIENTO DE LOS miRNAs Y SÍNTESIS DE cDNA.....	- 37 -
3.14 PCR A TIEMPO REAL DE miRNAs.....	- 37 -
3.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	- 38 -
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>- 39 -</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO. ....	- 41 -
4.2 LOS MΦ CIRULANTES DE PACIENTES CON LLC PRESENTAN UN ESTADO DE TE. ....	- 43 -
4.4.1. Caracterización del perfil inflamatorio.....	- 43 -
4.4.2. Marcadores fenotípicos en los MΦ de pacientes con LLC.....	- 46 -
4.3 VALOR PREDICTIVO DE HLA-DR EN LA LLC.....	- 51 -
4.4 FACTORES SOLUBLES POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL ESTADO DE TE EN MΦ DE PACIENTES CON LLC. ....	- 53 -
4.4.1. Posible implicación de DcR3 y del Ácido Hialurónico en la tolerancia.....	- 53 -
4.5 EL CONTACTO CÉLULA-CÉLULA ES NECESARIO PARA GENERAR LA TE EN MONOCITOS. ....	- 57 -
4.6 VÍAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN LA TE OBSERVADA EN LA LLC.....	- 58 -

4.6.1.	<i>Diseño de un modelo in vitro de TE.</i>	- 58 -
4.6.2.	<i>Producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de TE in vitro en LLC.</i>	- 61 -
4.6.3.	<i>Vías intracelulares implicadas en la TE del modelo in vitro de LLC.</i>	- 64 -
4.7	SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR IMPLICADA EN LA TE: PAPEL DEL MIRNA146A.	- 65 -
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>- 69 -</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>- 79 -</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>- 83 -</b>

## *ABREVIATURAS*

CBA: Cytometric Bead Array

CCL: Chemokine (C-C motif) Ligand

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférico

CXCL: Chemokine (C-X-C motif) Ligand

DAMP: Danger Associated Molecular Pattern

HA: Ácido Hialurónico

IL: Interleuquina

IRAK: Interleukin-1 Receptor Associated Kinases

Lφ: Linfocitos

LLC: Leucemia Linfática Crónica

LPS: Lipopolisacárido

M ± DE: Media ± Desviación Estándar

Mφ: Monocitos

MHC: Major Histocompatibility Complex

MMP: Matrix Metalloproteases (Metaloproteasas de la Matriz)

MyD88: Myeloid Differentiation 88

NF-κB: Nuclear Factor-κB

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern

qPCR: PCR cuantitativa

SFB: Suero Fetal Bovino

TLR: Toll-Like Receptor

VS: Voluntarios Sanos



## **1. *INTRODUCCIÓN***

---

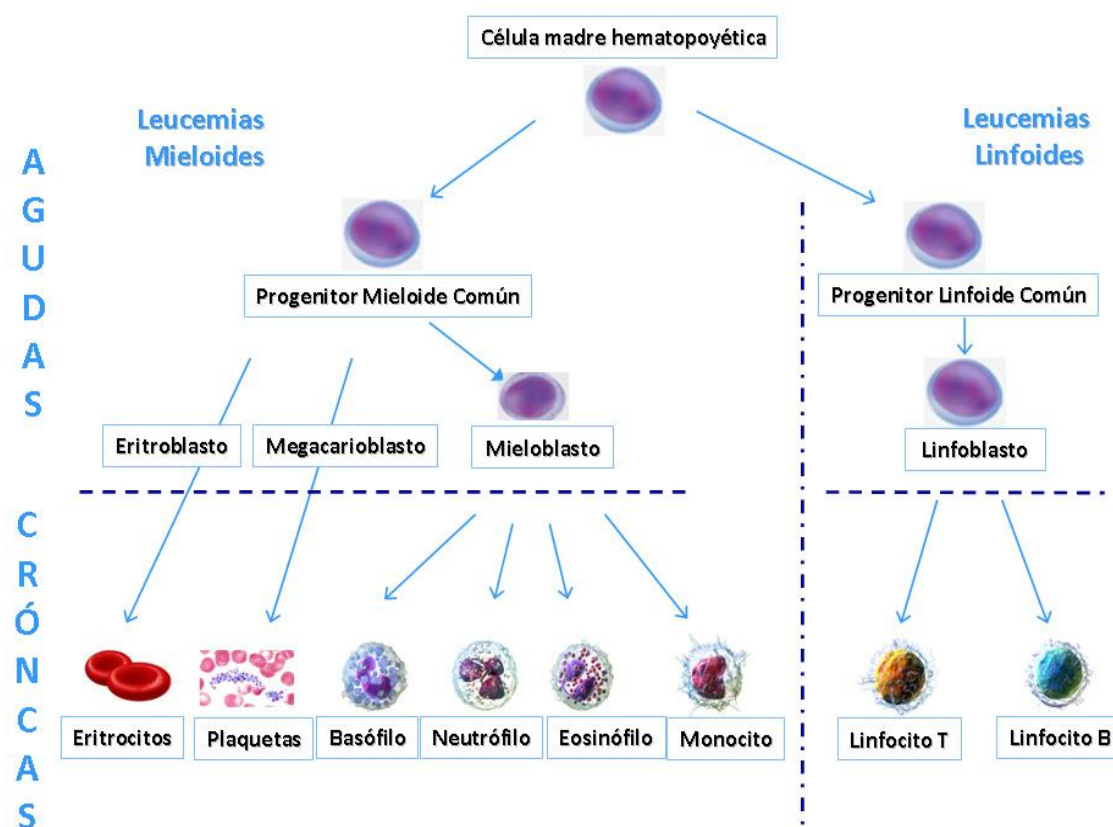




## 1.1 LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B.

La Leucemia Linfática Crónica (LLC) se define, según la última revisión de la clasificación de tumores del tejido hematopoyético y linfoide de la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una neoplasia linfoide B de célula madura (158). En la Fig. I1 se muestra un esquema de las líneas celulares que pueden ser afectadas en el sistema hematopoyético. La LLC es una enfermedad oncológica, caracterizada por la expansión clonal de linfocitos B ( $CD5^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD20^{dim}$ ,  $CD23^+$ ,  $SmIg^{dim}$ ), de pequeño tamaño, monomorfos y discretamente irregulares que se acumulan en la sangre periférica, los nódulos linfáticos, la médula ósea, el hígado y el bazo(157). Además, pueden estar acompañados de un pequeño porcentaje de prolinfocitos y parainmunoblastos que forman centros proliferativos en los tejidos que infiltran.

Figura I1. Esquema de la patogenia de las leucemias.



**Fig. I1: Patogenia de las leucemias:** Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas. Según el tipo de células que proliferan se dividen en agudas donde proliferan las células inmaduras o blastos y crónicas, donde proliferan las células maduras. Imagen modificada de (63).

La LLC es la forma de leucemia más común en los países occidentales, presentando una incidencia entre 2 y 6 casos por cada 100.000 habitantes/año. La edad media del diagnóstico es a los 65 años, a partir de entonces la incidencia se incrementa hasta en 12,8 casos por 100.000 habitantes/ año (157). Por sexos, presenta una proporción de 1,5-2 hombres frente a 1 mujer. La mayoría de los pacientes con esta patología presentan una enfermedad indolente que, en numerosos casos, se diagnostica en análisis rutinarios. Es una patología aún incurable, con una supervivencia media de 24 años, y puede presentarse sin progresión alguna. En la actualidad la estrategia médica consiste en tratar únicamente la progresión sintomática (2; 66; 143).

Para evaluar la evolución clínica de los pacientes con LLC se usa el sistema de clasificación Binet (18), ampliamente recomendado por las guías de LLC en la orientación del inicio del tratamiento (66). Los distintos estadios son 3:

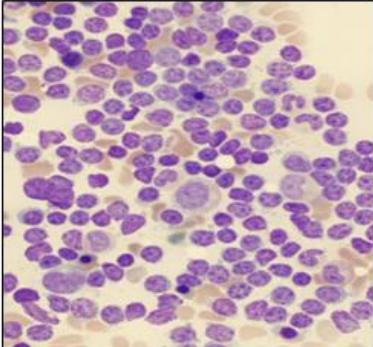
- Estadio Binet A: La linfocitosis no cumple los criterios para B y C. Normalmente los pacientes en este estadio no requieren tratamiento.
- Estadio Binet B: 3 o más áreas linfadenopáticas, no cumplen criterios para el estadio C. En algunos de los pacientes en este estadio se considera el tratamiento.
- Estadio Binet C: Además de los anteriores, anemia ( $Hb < 10g/dL$ ) o trombocitopenia (plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ ). La mayoría de los pacientes en este estadio requieren tratamiento.

Esta patología representa una de las principales causas de muerte en hematología oncológica en países occidentales(170). Según las estadísticas en Estados Unidos durante el año 2014 se diagnosticaron 5.980 nuevos casos de LLC y se produjeron 810 muertes atribuibles a la enfermedad(170). La LLC es la neoplasia hematológica con mayor predisposición familiar, se han documentado entre un 5-10% de casos de LLC en los que al menos existen 2 o más casos entre familiares. Además, el riesgo global se incrementa entre 2 y 7 veces más para los familiares de primer grado (57).

La LLC presenta siempre afectación en sangre y en médula ósea, aunque no siempre llega a presentar infiltración del ganglio linfático y la estructura ósea nunca se encuentra afectada (ver Figura I2). Las principales características morfológicas tanto en sangre periférica como en médula ósea son la presencia de células de pequeño tamaño, con cromatina condensada y escaso citoplasma (145). Además, estas células expresan IgM o IgD como inmunoglobulinas de superficie (slg), marcadores de célula linfocito B madura como CD19, CD20

y CD22, también co-expresan marcadores de células neoplásicas, CD5, CD23 y CD43, y carecen de marcadores de centro germinal. Por el contrario CD79b y FMC7 se expresan muy débilmente y el CD10 no se llega a detectar (49; 66).

**Figura 12.** Características de la Leucemia Linfática Crónica.

	ÓRGANO	AFECTACIÓN
	SANGRE PERIFÉRICA	SIEMPRE
	MÉDULA ÓSEA	SIEMPRE
	GANGLIOS LINFÁTICOS	A VECES
	HUESOS	NO

### 1.1.1. Características clínicas.

Las células afectadas en la LLC, los linfocitos B, forman parte del sistema inmune adaptativo. Se originan en la médula ósea y van pasando por diferentes etapas de maduración, cada una de las cuales se caracteriza por el estado de recombinación de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y por la expresión de ciertos marcadores de superficie (56). Existen diversos modelos en los que se postula como origen de las células tumorales las diferentes mutaciones en el gen de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Ighv)(86; 156). Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de esclarecer el origen de las células tumorales.

Por otro lado, alrededor del 80% de los casos de LLC presentan alteraciones citogenéticas detectadas por la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (160). El 50% de los pacientes presentan “deleción” en 13q14.3 (121), un 20% de los casos presentan trisomía del cromosoma 12 (195), con mucha menor proporción se encuentran “deleciones” en el 11q22-23, 17p13 y en el 6q21 (71). Estas alteraciones citogenéticas, junto con la expresión de diferentes proteínas de membrana, como la proteína 70 asociada a cadena ZAP (ZAP70) y CD38; forman parte de los factores a tener en cuenta en el pronóstico biológico de la enfermedad (162). Por otra parte, los factores de pronóstico clásicos que se evalúan son: i) los estadios clínicos, ii) el tiempo de duplicación linfocitaria, iii) el grado y el patrón de infiltración en médula ósea. Estos factores de pronóstico biológico resultan herramientas útiles para una apropiada terapia clínica.

### ***1.1.2. Papel del sistema inmune en la Leucemia Linfática Crónica.***

---

Entre las complicaciones que se pueden presentar en esta patología las infecciones secundarias se han descrito como una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad. Diferentes autores han descrito que el 50% de los pacientes con LLC han sufrido algún tipo de colonización patogénica, causando en el 70% de ellos su fallecimiento (56; 75; 124; 128; 154; 157). La patogénesis de las infecciones en estos pacientes es multifactorial, se debe a los defectos inmunes inherentes a la enfermedad y a la inmunosupresión relacionada con las terapias (127). En ellos se han descrito hipogammaglobulinemia, anormalidades en los subtipos de células T, defectos en las funciones de los neutrófilos y los monocitos (124; 154; 157) y en la funcionalidad del complemento (189). Por otra parte, las terapias administradas a estos pacientes generan una inmunosupresión específica, aumentando la deficiencia inmune de los pacientes.

Diferentes mecanismos se han discutido para explicar la asociación entre la LLC y el mayor riesgo de padecer infecciones en estos pacientes. La hipogammaglobulinemia se ha descrito como uno de los principales agentes causantes (124; 154; 157). Además, puede desempeñar un papel como indicador del avance de la enfermedad (178). Por otra parte, los tratamientos con purinas y con anticuerpos monoclonales también pueden tener un importante papel en este contexto. Estos tratamientos son causantes de la profunda y sostenida inmunodeficiencia observada en las células T. En cualquier caso, se ha observado que pacientes con cantidades normales de inmunoglobulinas y sin tratamiento que produjese inmunodeficiencia en las células T presentaban infecciones oportunistas (49; 153).

Diversos estudios también han evaluado el impacto en la inmunidad humoral y en las infecciones de las mutaciones en la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de las inmunoglobulinas, sin haber encontrado una asociación evidente (52; 172). En los pacientes con LLC un efecto secundario a la terapia puede ser la disminución del número absoluto de neutrófilos y monocitos, así como defectos en su función. De hecho, se han descrito deficiencias en la actividad fagocítica y bactericida de los neutrófilos, incluyendo un descenso en su capacidad quimiotáctica inducida por C5a (189). También se han mostrado deficiencias en los niveles de mieloperoxidasa, lisozima y b-gluconidasa en los monocitos (111).

Por todo ello, encontrar una relación entre los parámetros clínicos-biológicos de los pacientes y la predisposición a padecer infecciones puede ser una herramienta de gran utilidad, facilitando así la identificación de los diferentes subgrupos de pacientes para determinar la estrategia terapéutica o los tratamientos profilácticos apropiados que puedan ayudar a reducir la incidencia e impacto de las infecciones en estos pacientes.

## **1.2 EL SISTEMA INMUNE INNATO**

---

El sistema inmune está formado por un conjunto de células, órganos especializados y mecanismos encargados de proteger al organismo de infecciones y agresiones, a través de sus capacidades de identificación y eliminación de todos aquellos agentes que resulten patogénicos o dañinos. Podemos clasificar el sistema inmune en innato o adaptativo según el tipo de respuesta que predomine. Ambas respuestas se diferencian en los mecanismos, los tipos de receptores utilizados para el reconocimiento antigénico, las células efectoras y en las citoquinas y quimioquinas producidas.

El sistema inmune innato fue descrito por primera vez en el siglo XIX y está presente en todos los organismos multicelulares (191). Representa la primera barrera defensiva del organismo frente a diferentes agresiones, tales como quemaduras, intervenciones quirúrgicas o infecciones, y no requiere sensibilización previa (168). La inmunidad innata está compuesta por las barreras físicas y químicas como el epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales, las proteínas plasmáticas que forman parte del sistema del complemento y las proteínas de fase aguda. También se compone de diferentes tipos celulares como las NKs (del inglés Natural Killers), los neutrófilos, las células dendríticas y los monocitos/macrófagos (M $\phi$ )(155).

Las células del sistema inmune innato son capaces de reconocer estructuras altamente conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés PAMPs), el reconocimiento de estas señales por parte del sistema inmune innato se debe a tres razones principalmente: i)son estructuras invariables en una clase de microorganismos determinados, ii)se producen mediante vías únicas en los microorganismos, permitiendo así la discriminación entre lo propio y lo ajeno, y iii)los PAMPs tienen un papel esencial en la fisiología microbiana, limitando la capacidad que tienen los microorganismos para evadir el reconocimiento del sistema inmune a través de la evolución adaptativa de estas moléculas. Los PAMPs bacterianos

suelen ser en su mayoría componentes de la pared celular como el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano (PG) o el ácido lipoteicoico (LTA); en los hongos un importante PAMP es el  $\beta$ -glucano, principal componente de la pared fúngica. La detección de cualquiera de estas estructuras por el sistema inmune innato advierte de la presencia de microorganismos e inicia una respuesta inflamatoria(119).

Las células dendríticas y los M $\phi$  internalizan y procesan los antígenos, exponiendo los productos obtenidos a través de las moléculas principales de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). El complejo formado por el antígeno y el MHC-II es reconocido por los linfocitos T, iniciando la respuesta adaptativa. Además, el reconocimiento del patógeno por las células dendríticas y por los M $\phi$  activa diversas vías de transducción de señales que inducen la liberación de citoquinas tales como las interleuquinas (IL) 1 $\beta$ , IL6, IL8, IL12 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). También se induce la liberación de otras moléculas como la enzima activadora de plasminógeno, algunos radicales de oxígeno, peróxido, el factor activador de plaquetas y mediadores lipídicos de la inflamación (prostaglandinas y leucotrienos) (53). Por tanto, el tipo de activación de la célula presentadora de antígeno es crucial para determinar el tipo de respuesta inmune. Además, las células presentadoras de antígeno secretan IL12 e IL18, incrementando la función citotóxica de las células NK y los linfocitos T CD8+ (54; 150; 181), estimulando la secreción de IFN $\gamma$  y desencadenando la respuesta adaptativa Th1 (150). Por el contrario, la secreción de IL4 e IL10, induce una respuesta Th2 y la síntesis de anticuerpos (108; 129).

### ***1.2.1. Monocitos y macrófagos.***

---

Los monocitos y los macrófagos juegan un papel crucial en la respuesta del sistema inmune innato. Reconocen el patógeno a través de sus diferentes receptores, actúan como fagocitos e interconectan el sistema inmune innato con el sistema inmune adaptativo, actuando como células presentadoras de antígeno. Además, desencadenan una importante respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas (185). Son una población muy dinámica y heterogénea, responden de manera eficiente a los diferentes microambientes que se generan y tienen un importante papel en la regulación de la homeostasis tisular. Son capaces de sufrir profundos cambios fenotípicos, para adaptarse a su microambiente y desarrollar una respuesta apropiada. Por su parte, los macrófagos residentes actúan combatiendo infecciones, resolviendo inflamaciones agudas y regulando la respuesta metabólica en situaciones de estrés (113).

### **1.2.2. Polarización M1/M2 y sus características.**

---

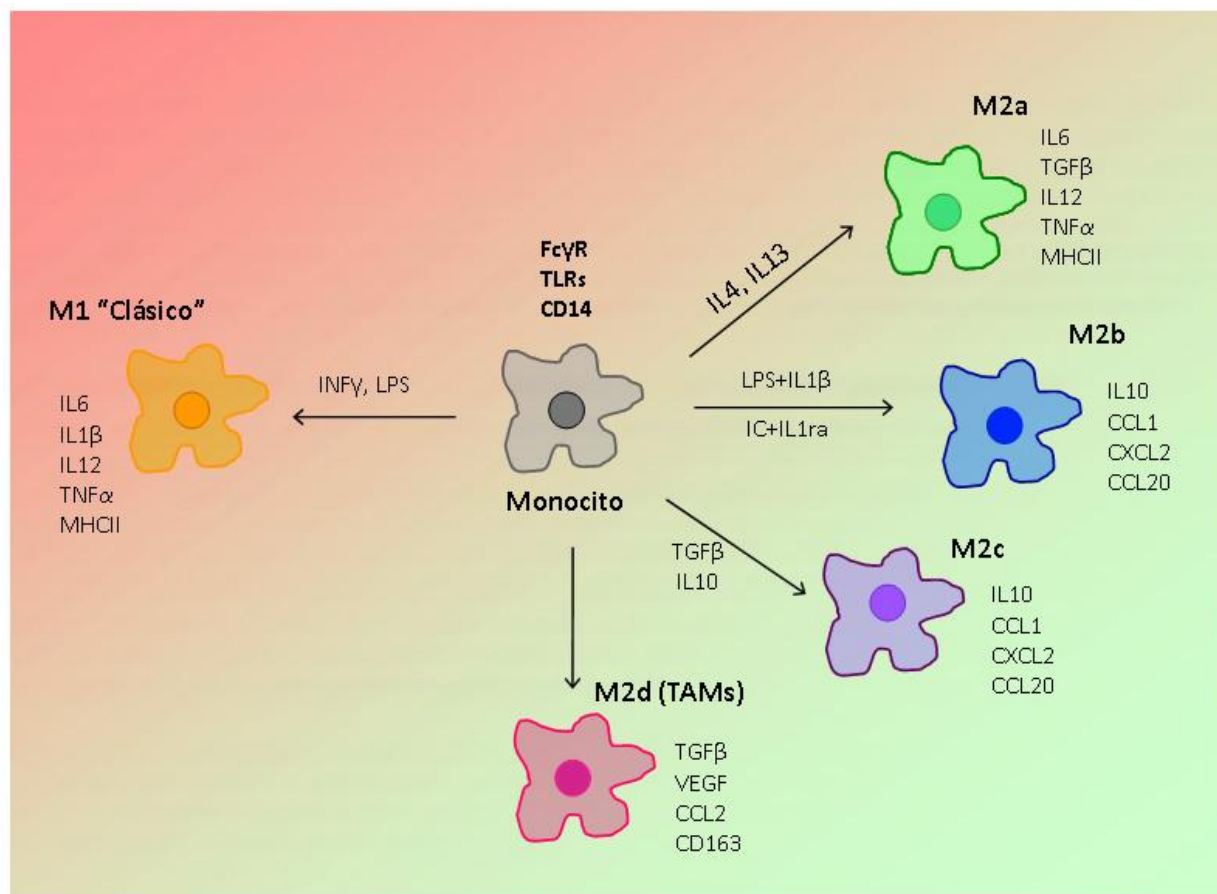
Los monocitos/macrófagos (M $\phi$ ) poseen una gran plasticidad fenotípica y funcional, son capaces de desarrollar un amplio rango de funciones como procesos inflamatorios, actividad antimicrobiana, inmuno-regulación, remodelación del tejido y promoción del tumor; todo ello dependiendo del microambiente. Acorde a la funcionalidad los M $\phi$  se pueden clasificar en dos grupos, los clásicamente activados o M1 (6) y los alternativamente activados o M2, que incluye diferentes fenotipos solapados (M2a, b, c, d), definidos como aquellos M $\phi$  activados de cualquier otra forma que no sea M1 (59). Los M $\phi$  clásicamente activados se inducen mediante estímulos de origen bacteriano, como el LPS y citoquinas de tipo Th1 como el Interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Estos M $\phi$  son pro-inflamatorios y presentan capacidad para secretar citoquinas inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL12 y quimioquinas y especies reactivas del oxígeno. Además promueven una respuesta Th1, poseen actividad anti-microbiana, protegen contra distintos tipos virus y también desempeñan funciones anti-tumorales (35; 36).

Por otro lado, citoquinas Th2 como IL4, IL10 o IL13 inducen en los M $\phi$  un estado de activación alternativo. Inicialmente, estos M $\phi$  M2 fueron descritos como células con una reducida capacidad inflamatoria. Posteriormente, otras características como una alta capacidad fagocítica, poca habilidad para la presentación antigénica, así como funciones de remodelación de tejido y de eliminación de parásitos como el helminto se han añadido al fenotipo de estas células (117). Otros estudios han demostrado que, además de la IL4, IL10 e IL13, la dexametasona, la combinación de inmunocomplejos o una prolongada exposición al LPS pueden también inducir un estado M2, con las variaciones de los distintos fenotipos M2a, b, c, d (114). Los M $\phi$  M2 se identifican en general por la producción de factores anti-inflamatorios como IL10, el Factor de Crecimiento Transformante beta (en inglés TGF $\beta$ ), CCL18 y por la expresión del receptor depurador o “scavenger” CD163 (28; 117; 176). Dependiendo de la subclasificación, las células alternativamente activadas tienen características diferentes. En el caso de la activación M2a y M2b, promueven una respuesta adaptativa Th2, mientras que los M2c están involucrados en la resolución de la inflamación y la reparación del tejido (35; 36). En cambio los macrófagos M2d, también denominados macrófagos asociados a tumores (TAMs), contribuyen a la permanencia, la propagación y la metástasis del tumor (115) (Fig. I3).

Diversos modelos *in vitro* se han desarrollado para clasificar los diferentes fenotipos de activación M1 o M2 en distintas patologías, como sepsis, cáncer u obesidad (22; 24; 107). Sin embargo, es importante considerar la complejidad que existe *in vivo*, donde la amplia diversidad de estados de activación en respuesta a diferentes estímulos y ambientes conforma un rango continuo y cambiante de fenotipos. En este contexto se han descrito M $\phi$  con fenotipos

intermedios y solapantes (9; 24; 107). Los fenotipos M1 y M2 representan los extremos de un amplio espectro de estados de activación dependiendo de las señales del entorno. Las principales características de los Mφ y sus distintos fenotipos están detallados en la figura 13.

**Figura 13.** Clasificación y principales características de los Mφ.



Cabe destacar que muchos autores han descrito una población celular "M2-like" que clasifican como células tolerantes por tener una activación y fenotipos no clásicos (ver capítulo "Tolerancia a endotoxinas") (22; 59; 117).

### **1.2.3. Macrófagos asociados a tumor.**

Numerosos estudios han relacionado los macrófagos asociados a tumores (en inglés TAMs) con transformación oncogénica, larga supervivencia de las células transformadas y carcinogénesis inducida por la inflamación crónica (67; 80). La acción de los TAMs es mediada por citoquinas inflamatorias como **TNFα**, **IL6** e **IL1β** que se liberan al medio y que pueden generar daño en el ADN.



En general, las citoquinas inflamatorias producidas por los TAMs ejercen una influencia directa sobre el reclutamiento de las células del estroma, la invasión de células tumorales, la supervivencia y la angiogénesis. Además, expresan una variedad de factores pro-angiogénicos como el VEGF $\alpha$ , EGF, y CXCL18. Diferentes estudios han demostrado que los M $\phi$  favorecen la metástasis a través de la liberación de quimioquinas y metaloproteasas (MMPs). Por ejemplo, en un modelo de carcinoma mamario espontáneo se ha comprobado que la depleción de los TAMs reduce significativamente la metástasis pulmonar (101). También se ha visto que los macrófagos son esenciales para la progresión tumoral y la metástasis en un modelo de carcinoma espontáneo de piel (8).

Las características de los TAMs descritas muestran que estas células colaboran en funciones tumorales como la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, la proliferación, la invasión y la angiogénesis (151). En cambio, no son capaces de secretar citoquinas pro-inflamatorias, ni desarrollar funciones tumoricidas (21; 65; 169; 184). Todas estas características, en su conjunto, sugieren que presentan un estado de activación M2 o tolerante (115), aunque se ha descrito que pueden presentar características de ambos fenotipo al mismo tiempo (21). Estos trabajos demuestran la importancia de caracterizar los diversos subtipos de TAMs presentes en las distintas patologías, estudiando las diferentes funciones que desarrollan según su localización y las propiedades que poseen; ya que pueden representar una diana terapéutica frente al tumor.

A pesar de que la mayoría de las evidencias que demuestran el papel de los M $\phi$  en la progresión del cáncer provienen de modelos tumorales en ratones, relativamente poco se conoce de su contribución en cánceres humanos. Además, en general estos estudios se han centrado en el papel de los monocitos en tumores sólidos o epiteliales. De modo que poco se conoce de su contribución en la progresión de los cánceres hematológicos como las leucemias y los linfomas. Se ha descrito como los monocitos en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de precursores de las células B son capaces de establecer una comunicación con las células malignas, a través de CXCL10, promoviendo su capacidad invasiva mediante la inducción de la secreción de MMP9 en las células tumorales, además de la progresión del mismo y la posible diseminación metastásica (95). En esta misma línea se ha descrito como los TAMs en linfoma folicular expresan STAT1, el principal factor de transcripción para la expresión de CXCL10, y su número se correlaciona con un mal pronóstico (7).

Por otra parte, también se ha descrito la presencia de monocitos con fenotipos “M2-like” en leucemia mieloide aguda, donde se ha comprobado que un incremento de la presencia de la arginasa de tipo II puede conducir a la generación de este fenotipo en los M $\phi$  y mantener

la inmunosupresión presente en este tipo de leucemia (132). Además, en la LLC también se han encontrado M $\phi$  con propiedades inmunosupresoras, capaces de inhibir la proliferación de las células-T, de secretar citoquinas pro-angiogénicas como la IL8 y con una incrementada capacidad para la migración(111).

#### **1.2.4. Receptores tipo Toll (TLRs)**

---

Las células del sistema inmune innato son capaces de reconocer estructuras conservadas de los microbios, denominados PAMPs cuando se enfrenta a una infección. El reconocimiento de los diferentes PAMPs por parte de estas células se realiza mediante una serie de receptores de reconocimiento de patrones codificados por la línea germinal (en inglés PPRs), estos receptores permiten un reconocimiento semi-específico (5).

Hasta la década de los 90 que se descubrieron los receptores tipo Toll (TLR) en humanos, se creía que la inmunidad innata reconocía los patógenos de manera no específica. En 1992 Charles Janeway Jr. y Ruslan Medzhitov llevaron el campo de la inmunología innata en una nueva dirección con su concepto del reconocimiento selectivo de estructuras microbiales conservadas mediante PPRs (78). Existen 4 tipos de PPRs, los receptores tipo Toll (en inglés Toll-like receptors, TLRs), los receptores C tipo lectinas (LLCR), los receptores de nucleótidos con repetición de dominios ricos en leucinas (NLRs) y los receptores helicasa (RIG-I) (5).

Los TLRs fueron descubiertos en 1985, y reciben su nombre debido a la similitud que presentan con la proteína codificada por los genes Toll identificados en *Drosophila melanogaster* por Christiane Nüsslein-Volhard (68). Estos receptores son proteínas transmembrana tipo I, presentan un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR) formando una estructura cóncava implicada en el reconocimiento de los patógenos (5). El papel de los TLRs en la defensa antimicrobiana fue descrito en 1996 por Bruno Le maitre *et al.* (10), quien observó como las moscas de la fruta morían rápidamente por aspergilosis al perder el homólogo del recetor toll en los insectos. Este fenómeno, explica el hecho de que todos los dominios extracelulares contengan repeticiones ricas en leucina y un dominio citoplasmático Toll/IL-1R (TIR), crucial para la señalización interna (141). Los PAMPs además de otras estructuras propias, denominado patrones moleculares asociados a peligro (del inglés Danger associated molecular pattern, DAMP) son reconocidos por los TLRs. Desde que se descubrió la existencia de estos receptores en mamíferos se ha comprobado que se expresan en humanos y en ratones, tanto en la línea mieloide como en la línea linfoide (6). Los TLRs detectan los productos microbiales y juegan un importante papel en la inmunidad innata. En la actualidad se han identificado 11 tipos

de TLRs en humanos con importantes funciones en inmunidad innata, en la defensa del organismo y en los primeros pasos de la respuesta inflamatoria. Los TLRs en los leucocitos se sitúan en la membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 y TLR11) o bien en endosomas (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9).

La mayoría de los TLRs tienen la capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria mediante la traslocación al núcleo de un importante factor de transcripción, el NF- $\kappa$ B. Este factor de transcripción actúa uniéndose a los promotores de diferentes genes, facilitando su transcripción y la consecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$  y la IL6 (36; 40; 42). NF- $\kappa$ B es clave en la respuesta inflamatoria de los M $\phi$  al regular la expresión de numerosas citoquinas como TNF $\alpha$ , IL12, IL6, IL1 $\beta$  y COX2, todas ellas características de un estado de polarización M1 (16). Su activación está regulada a través del complejo IKK formado por 2 quinasas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , además de por una proteína reguladora, IKK $\gamma$  (o NEMO). La señalización a través de IKK provoca la activación/fosforilación de IKK $\beta$ , que a su vez fosforila al inhibidor de Kappa B ( $\kappa$ B). Estas fosforilaciones terminan en la degradación por el proteosoma de I $\kappa$ B, liberando el heterodímero de NF- $\kappa$ B formado por p65/p50 del complejo NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B, que pasa al núcleo dónde se une a los promotores de genes inflamatorios (16; 170).

Los TLRs tienen capacidad para inducir señalización en vías divergentes, lo que generan la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tanto dependientes de NF- $\kappa$ B, como independientes de este factor de transcripción. Además, los TLRs y otros PPRs activan a las células presentadoras de antígeno creando, de esta manera, un puente de unión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa mediante una coordinada respuesta de las células T y de las células B (76).

#### **1.2.5. Señalización asociada a TLR4**

---

El receptor TLR4 es uno de los primeros miembros de la familia Toll que se identificó en mamíferos y ha sido, hasta el momento, el mejor caracterizado (119). Se encuentra expresado en células endoteliales, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (77). Este receptor se localiza en la membrana plasmática y es esencial para la respuesta frente al LPS, componente principal de la superficie externa de bacterias Gram negativas. La señalización inflamatoria a través del receptor TLR4 termina con la translocación del factor de transcripción NF $\kappa$ B al núcleo (74; 109; 133; 147). En primer lugar, la activación de TLR4 señala en el interior de la célula a través de dos moléculas adaptadoras, MyD88 y TRIF. La vía dependiente de MyD88 permite la activación de la cascada de quinasas seronina/treonina asociadas al receptor de interleucinas IRAK-1, IRAK-4, TRAF6, y las IKK $\beta$ , finalizando en la activación de NF- $\kappa$ B, dando

lugar a la expresión de diferentes citoquinas pro-inflamatorias como son el TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL12 (74; 109; 133; 147). Por otra parte, la señalización a través de la vía TRIF activa al factor 3 de respuesta del interferón (IFR3) que desencadena la expresión de los interferones de tipo I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ), activando el factor de transcripción STAT1 a través del receptor INFAR. Además, el IFN de tipo II (IFN $\gamma$ ) también activa STAT1. Ambos, IFR3 y STAT1, inducen la expresión de citoquinas como CCL2, CCL5 y CXCL10 (145; 194).

La señalización inflamatoria debe ser regulada finamente para una correcta respuesta. Defectos en la señalización de TLR4 a nivel de las moléculas adaptadoras (MyD88 y TRIF), a nivel de las moléculas de señalización y de los factores de transcripción se han relacionado con una mala respuesta inflamatoria (77; 103). Por otro lado, existen reguladores negativos de la señalización a través de los TLRs, tales como IRAK-M que antagoniza la señalización del TLR a través de interacciones proteína-proteína previniendo la subsiguiente activación de IRAK-1 (87). Se ha estudiado el papel de IRAK-M en patologías como sepsis o cáncer, donde se ha descrito que su expresión contribuye a que patógenos o células tumorales de origen diferente evadan el sistema inmune (35; 37). También se ha descrito que la tolerancia a endotoxinas en los M $\phi$  humanos y de ratón está asociada con un descenso en la formación del complejo TLR4-MyD88-IRAKs, debido a una disminución de la actividad de la kinasa IRAK-1 y de la expresión de TRAF6 (25; 77; 98; 148; 179).

### ***1.3 TOLERANCIA A ENDOTOXINAS.***

---

El proceso por el cual un patógeno es reconocido por las células del sistema inmune genera una fuerte reacción inflamatoria por lo que necesita ser finamente regulado. La tolerancia a endotoxinas (TE) se caracteriza por una respuesta inflamatoria atenuada a un segundo estímulo, siendo este, un posible mecanismo de protección frente al shock séptico en pacientes (20; 30; 51).

La primera referencia conocida de la TE es de 1946 cuando Paul Beeson mostró que una inyección de la vacuna tifoidea aplicada de forma repetida causaba una progresiva reducción de la fiebre (51). Estos hechos también se observaron en humanos que se recuperaban de las fiebres tifoideas y de la malaria, que al ser re-estimulados con la endotoxina presentaban una patente reducción de los síntomas como la fiebre (30). De la misma manera, trabajos en ratones demuestran que la exposición previa a una dosis sub-lethal de LPS les protege cuando se tratan

posteriormente con una dosis letal de la misma endotoxina. Todos estos estudios *in vivo* con ratones demostraron que las células principalmente responsables de la TE son los monocitos/macrófagos (30). Además, en diversos modelos *in vitro* de TE se ha comprobado que tanto los macrófagos de ratón como los monocitos humanos expuestos a pequeñas concentraciones de LPS muestran una incapacidad para la respuesta inflamatoria tras un segundo estímulo de esta endotoxina (33; 40; 50).

Uno de los signos más claros de la TE, es la drástica reducción en la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  en comparación con aquellas células que sólo se exponen una única vez a la endotoxina (22). Estudios posteriores han demostrado las numerosas modificaciones que sufren los M $\phi$  en su transcriptoma cuando son re-estimulados con el LPS, la mayoría de genes que son regulados negativamente son aquellos que codifican para citoquinas y quimioquinas inflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ , IL6, IL12, IL1 $\beta$ , CCL13, CCL4 y CXCL10 (33; 42; 51; 112). Sin embargo, los genes que presentan una activación codifican para citoquinas anti-inflamatorias como IL10, TGF $\beta$  y el receptor de la IL1, receptores de lectinas de tipo C como MARCO, CLEC4a y CD64, reguladores negativos de la vía TLR-MyD88 como IRAK-M y una gran variedad de genes anti-microbiales como FPR1, AOA1 y RNASET2 (48; 51; 53; 54). Todos estos cambios indican una importante reprogramación genómica. La tolerancia se describe como un proceso de reprogramación de la respuesta inmune avalado por un número de mecanismos moleculares que se activan cuando se produce dicho fenómeno (30; 88).

A nivel funcional, los M $\phi$  que se encuentran en un estado de TE presentan un importante incremento de su capacidad fagocítica, conservando la habilidad para eliminar los patógenos internalizados (33; 125). Además, el incremento de la fagocitosis suele ir acompañado de altos niveles de expresión del marcador de membrana CD64 y de una disminución de la presentación antigénica, afectando directamente a la expresión de varias moléculas de HLA de clase II, como HLA-DR, aparentemente debido a la disminución del principal gen regulador de la expresión de HLA-II, CIITA (33; 125; 193). En la TE también se observa una baja capacidad inflamatoria y un aumento de la secreción de las citoquinas anti-inflamatorias que participan en la protección frente a un shock séptico.

Tal y como comentamos en un capítulo anterior, numerosas características de los M $\phi$ TE se equiparan con el fenotipo que presentan los M $\phi$  alternativamente activados o M2. Asignar la TE a un estado de polarización concreto implica simplificar el estado fisiológico, ya que diferentes variaciones fenotípicas dependen del contexto, del estímulo y del modo de tolerización (30).

### **1.3.1. Implicaciones clínicas de la tolerancia.**

---

Una de las características de la TE es la reducida capacidad inflamatoria de las células del sistema inmune (principalmente monocitos/macrófagos) junto con una menor capacidad de presentación antigénica y una mayor actividad fagocítica (18; 33). Inicialmente la TE puede parecer un buen mecanismo de protección frente a respuestas exageradas como ocurre en el shock séptico y la isquemia pero su incidencia, se ha relacionado con un alto riesgo de padecer infecciones secundarias. Por ejemplo, en sepsis, la mortalidad debida a infecciones secundarias se ha asociado con una incidencia de un fenotipo de TE (126). De igual forma, en la fibrosis quística la TE se correlaciona con un incremento en la susceptibilidad de infecciones nosocomiales. Además, un patrón similar a la TE de los pacientes que sufren septicemia se puede observar en los pacientes de síndrome coronario agudo (47; 187). En ambos casos se ha comprobado que los M $\phi$  presentan un incremento de los niveles de expresión de IRAK-M y baja producción de TNF $\alpha$ . Por otro lado, pacientes con fibrosis quística los M $\phi$  circulantes se encuentran en un estado de TE, donde el receptor, aún huérfano, TREM-1 parece jugar un papel importante(33; 34).

En cáncer, se ha descrito que los TAMs muestran características fenotípicas muy similares a las de la TE, una disminuida secreción de citoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL12p40, IL6, etc.) y un aumento de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias (TGF $\beta$ , IL10, etc.) tras una estimulación *ex vivo* con LPS (21). Este proceso se ha explicado debido a una activación defectuosa de NF- $\kappa$ B, una acumulación de homodímeros p50 de NF- $\kappa$ B, y una activación de la vía TRIF, algo similar a lo que ocurre en la TE (20; 21; 159).

Nuestro grupo ha demostrado que el co-cultivo *in vitro* de líneas tumorales con M $\phi$  humanos genera un estado refractario frente a otros tumores (175). Según nuestros datos la pseudokinasa IRAK-M aumenta su expresión en estos M $\phi$ . Por otra parte, otros autores han demostrado que los ratones IRAK-M<sup>-/-</sup> presentan una resistencia al crecimiento del tumor después de la inoculación de células tumorales (197). Estos datos, sugieren que la TE puede estar implicada en numerosas patologías, y que puede jugar un importante papel en la inmunosupresión. Es por ello que un estudio más profundo de la TE podría proporcionar nuevas posibilidades de terapia en este aspecto.

### **1.3.2. Fenómenos de tolerancia cruzada.**

---

El término de tolerancia cruzada se aplica a todos los casos en los que la tolerancia se desarrolla a partir de un estímulo inicial de distinta naturaleza del estímulo posterior (39). Estudios publicados por Lenher *et al.* en 2001 describen como el pre-tratamiento de los macrófagos con un producto bacteriano como el ácido lipoteicoico (ligando del TLR2) es capaz de inhibir la secreción de TNF $\alpha$  inducida por LPS (ligando del TLR4)(96). Otros autores han descrito como la tolerancia frente al LPS en los M $\phi$  puede generarse a través de un receptor que no pertenece a la familia de los TLRs. Un ejemplo de ello, es como la pre-exposición de los macrófagos humanos al 25-hidrocolesterol, un producto de las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas de baja densidad involucradas en la aterogénesis, inhibe la unión de NF- $\kappa$ B al promotor de TNF $\alpha$  e imposibilita la expresión del mRNA que codifica para el TNF $\alpha$  en respuesta a una segunda estimulación con LPS (45). En este contexto se ha demostrado como la inflamación sistémica producida por una hemorragia, una cirugía, un trauma o una transfusión sanguínea, pueden conducir a este estado tolerante, denominado tolerancia cruzada (36; 47). En consecuencia, diversos estímulos exógenos y endógenos pueden inducir un estado de hiposensibilidad a la estimulación con LPS. Por lo tanto, la tolerancia no sólo es un mecanismo específico en respuesta a la inflamación por la endotoxina, sino que parece ser un mecanismo de protección frente a una inflamación excesiva, resultando en una reprogramación anti-inflamatoria del conjunto del sistema inmune (22).

Uno de los principales mecanismos subyacentes descritos de la TE es modulación de la actividad de NF- $\kappa$ B debido a la expresión de los reguladores negativos de la vía de señalización de los TLRs. La implicación de ligandos endógenos, DAMPs, no puede excluirse de este proceso. Se sabe que moléculas como el HA, HMGB1 o la fibronectina son capaces de activar la señalización a través de los TLR e inducir características fenotípicas de TE bajo determinadas condiciones (3; 85; 92; 105). Los receptores endógenos, como NOD2, se han relacionado con la inducción en la tolerancia a bacterias (85). Finalmente, la presencia crónica de citoquinas inflamatorias como son TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , también pueden llegar a contribuir a la inducción de la TE (39).

La heterotolerancia también puede estar causada por la modulación epigenética y/o por la regulación de los miRNAs, ya que en muchos casos estos cambios pueden tener su origen en la propia regulación negativa de la inflamación. Un ejemplo de ello es el trabajo de Edel M. Quinn *et al.*; donde se describe como la estimulación previa de la línea monocítica THP1 con lipoproteína bacteriana, estimulando la vía de TLR2, provoca un aumento de la expresión del

miRNA146, afectando la expresión de IRAK1 y TRAF6, ambas proteínas dianas de este miRNA. Finalmente se genera un estado análogo a la TE que impide la secreción de TNF $\alpha$  frente a un estímulo posterior con gran negatividad (152).

## **1.4 LOS miRNAs EN EL SISTEMA INMUNE.**

---

### **1.4.1. Biogénesis de los miRNAs.**

---

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas no codificantes de RNA de cadena simple y de pequeño tamaño, entre 15 y 25 nucleótidos de longitud. Se encuentran ampliamente conservados en los organismos eucariotas y se consideran importantes componentes de la regulación génica (182). Su descubrimiento ha cambiado la comprensión de la expresión y el funcionamiento del genoma en mamíferos. Se estima que, un solo miRNA puede regular cientos o incluso miles de genes diana. Aproximadamente entre el 30% y el 92% de los genes humanos pueden encontrarse regulados por miRNAs (44). La expresión y la función de los miRNAs son esenciales para el correcto desarrollo de las funciones fisiológicas y el mantenimiento de la homeostasis celular (75-77).

La biogénesis de los miRNAs y su regulación ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los últimos 10 años y revisada recientemente en numerosas publicaciones (14; 29; 83; 192). En la vía canónica de la biogénesis los transcritos primarios de los miRNAs, denominados pri-mi-RNAs, se transcriben principalmente por una RNA polimerasa II. Estos generalmente poseen de 100 a 1000 nucleótidos de longitud y en su estructura contienen una o varias estructuras de horquilla (83). Los pri-miRNAs se cortan en el núcleo mediante un complejo microprocesador formado por la enzima RNasa III, Drosha, y por la proteína de unión a RNA de doble cadena, DGCR8 (del inglés DiGeorge Syndrome Critical Region Protein 8), para producir así el precursor de los miRNAs, el pre-miRNA (62; 94). Los pre-miRNAs son exportados del núcleo al citoplasma mediante la proteína transportadora Exportina 5. Una vez en el citoplasma, son procesados de nuevo por una RNasa III, Dicer, para producir miRNAs de doble cadena con uniones imperfectas y longitud de unos 22 nucleótidos. Estos miRNAs inmaduros y la proteína Argonauta (Ago), forman el complejo de silenciamiento del RNA, denominado RISC. Para formar el miRNA maduro la cadena complementaria se degrada, dejando en el RISC una única cadena de miRNA preparado para ejercer su acción reguladora (12; 83; 175). Una vez cargado en el RISC, el miRNA maduro interactuará con la región 3'UTR (del inglés untranslated region) de su mRNA diana para regular



su expresión. En los miRNAs existen entre 2-8 nucleótidos cruciales para el reconocimiento de la diana. De hecho, el grado de complementariedad entre esta región específica y la región 3'UTR del RNA mensajero determina el tipo de regulación génica que ejerce el miRNA, que puede ser, mediante la represión de la traducción, el corte y la degradación del RNA mensajero diana (14; 29; 97).

#### ***1.4.2. El papel de los miRNAs en el desarrollo del sistema inmune.***

En la actualidad se está incrementando la identificación de dianas de miRNAs en estudios funcionales, demostrando que los miRNAs se encuentran involucrados en la mayoría de los procesos celulares que se investigan (15). Parece claro que cambios en la expresión de los miRNAs son críticos para numerosos procesos biológicos tales como el desarrollo y la diferenciación celular.

Existen numerosos trabajos en los que se ha detallado el papel que juegan los miRNAs en la diferenciación y la maduración de las células del sistema inmune (140; 144). Debido a las novedosas implicaciones de los miRNAs en la regulación de la respuesta del sistema inmune, se están estableciendo distintas relaciones entre una desregulación en la expresión de los miRNAs y la aparición de diferentes patologías, incluyendo el desarrollo de tumores, la inflamación crónica y las enfermedades auto-inmunes (69).

La importancia que tienen los miRNAs en la regulación de la respuesta del sistema inmune se ha hecho evidente en diversos estudios, en los cuales se muestra como los miRNAs son capaces de alterar la respuesta de los M $\phi$  a los PAMPs o a la estimulación de las citoquinas inflamatorias (55; 139; 179; 182). Los receptores tipo Toll (TLRs), presentes en la membrana de los M $\phi$  y cuya función es reconocer y unir los PAMPs, se encuentran también altamente regulados *in vivo* por diferentes reguladores negativos para evitar una excesiva inflamación (100).

Uno de los miRNAs ampliamente descritos como regulador negativo en las vías señalización de los receptores TLR es el miRNA146a. Se ha comprobado que este miRNA se sobre-expresa en respuesta a la estimulación con ligandos conocidos de los TLRs y con citoquinas inflamatorias como la IL1 $\beta$ . Algunos análisis exhaustivos para determinar la importancia biológica de la sobre-expresión del miRNA146a han demostrado que su expresión es dependiente de NF- $\kappa$ B, y que se asocia con la presencia de un sitio de unión en la región promotora encargada de regular la producción de citoquinas inflamatorias como IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en

M $\phi$ , afectando a la señalización de estas moléculas. Esta sobre-expresión también se ha observado en respuesta a señales de activación de los receptores TLR2 y TLR5 o a la estimulación con citoquinas inflamatorias como el TNF $\alpha$  y la IL1 $\beta$  (179). En la vía de señalización de TLR4, tanto IRAK-1 como TRAF6, dos quinasas esenciales en la secreción de citoquinas inflamatorias, se han descrito como dianas directas del miRNA146a (179).

En un estudio *in vitro* de TE, se demostró que durante la tolerancia a LPS el miRNA146a se encuentra sobre-expresado, ejerciendo un efecto negativo, a nivel post-transcripcional, sobre el mRNA de IRAK-1 y TRAF6 (135). Previamente Li *et al*(99) y Boone *et al*(27) observaron que, debido a la tolerancia generada por el LPS en los M $\phi$ , se producía una deficiencia en la actividad quinasa de IRAK-1 y de TRAF6 en la señalización de TLR4, respectivamente. Curiosamente, tanto IRAK-1 como TRAF6 son moléculas presentes en la vía de señalización de TLR4 que también participan en la señalización de otros TLRs como el TLR2, TLR5, TLR7, TLR8 y TLR9, además del receptor de la IL-1 $\beta$  (90). Considerando que el miRNA146 tiene como dianas el mRNA de IRAK-1 y TRAF6, siendo estas moléculas compartidas por todos los TLRs excepto por TLR3, este miRNA se considera una molécula con un alto potencial regulador. Existen artículos en los que se demuestra que el aumento en la expresión del miRNA146a, a partir de la estimulación con LPS en los M $\phi$ , puede influir en la respuesta de estas células a ligandos de otros TLRs; controlando así la producción de citoquinas inflamatorias y dando lugar a una tolerancia cruzada (135).

Todos estos datos en conjunto demuestran la importancia que tienen los miRNAs en la regulación de la respuesta del sistema inmune para prevenir una excesiva inflamación en el organismo.

## **2. OBJETIVOS**

---



El objetivo principal del presente trabajo es identificar las causas implicadas en el incremento de infecciones que sufren los pacientes con leucemia linfática crónica. Para ello, se estudia el papel del sistema inmune innato en los pacientes con esta patología. Este trabajo se realiza tanto en muestras de pacientes con leucemia linfática crónica como en un modelo *invitro* desarrollado para este fin.

Se establecieron los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el perfil inflamatorio y la respuesta de los M $\phi$  aislados de sangre periférica de pacientes con leucemia linfática crónica en comparación con la respuesta de M $\phi$  en voluntarios sanos. Correlacionar el perfil inflamatorio con la evolución clínica de los pacientes incluidos en el estudio.
2. Estudiar los productos generados en el microambiente por las células tumorales y evaluar la capacidad de generar tolerancia frente al LPS en M $\phi$  aislados de voluntarios sanos.
3. Diseñar un modelo *in vitro* válido con las características fenotípicas y funcionales de la tolerancia endotoxinas observadas en la leucemia linfática crónica en los M $\phi$  humanos aislados de buffy coat.
4. Determinar las posibles vías de señalización alteradas de la respuesta inflamatoria normal en los monocitos aislados de sangre periférica de los pacientes con leucemia linfática crónica.



### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***

---





### 3.1 REACTIVOS

---

Todos los reactivos utilizados se compraron en las siguientes casas comerciales: Merck (Darmstad, Alemania), Sigma (San Luis, MO, EEUU), BD Biosciences (San José, EEUU). El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 y DMEM (Dulbecco's ME) ambos de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). El medio se suplemento con 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino (SFB), todo de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). Para las tinciones intracelulares la Brefeldina A fue obtenida de Sigma Aldrich

El LPS utilizado se aisló de *Salmonella abortus*, y fue donado por los doctores Chris Galanos y Manuel Modollel, del Max Planck Institute für Immunobiologie de Freiburg, Alemania. El ácido hialurónico (HA) fue suministrado por R&D Systems, Minneapolis, EEUU.

### 3.2 PACIENTES

---

La cohorte de pacientes reclutados para este estudio se clasificaron como LLC de acuerdo con la 4ª edición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la clasificación de tumores hematopoyéticos y de tejidos linfoides (158). Los pacientes se incluyeron en el estudio en la obtención de su primer diagnóstico y no se encontraban en tratamiento en el momento de su inclusión. Se establecieron como criterios de exclusión el haber padecido alguna infección un mes antes de su inclusión en el estudio, el tratamiento con inmuno-supresores, padecer VIH, hepatitis B y C, el haber padecido o padecer otros cánceres, diabetes mellitus y otras patologías relevantes.

Se recogieron muestras de sangre de todos los pacientes incluidos en el estudio (n=70), así como de 20 voluntarios sanos (VS) con edad y sexo equivalentes a la de los pacientes recogidos en el estudio. Se excluyeron aquellos VS que habían padecido algún tipo de cáncer o patología relevante con anterioridad.

En la tabla R1 se resume las características generales de los pacientes incluidos en el estudio (edad media, su distribución por sexos, constantes clínicas, citogenética, niveles de la  $\beta$ 2microglobulina, de la lactato deshidrogenasa (LDH), y la presencia de la proteína zap70).

Tanto de los pacientes con LLC como de los VS se obtuvo una muestra de 30ml de sangre venosa periférica. Para evitar la variabilidad circadiana en la secreción de citoquinas todas las muestras fueron procesadas entre la 8 AM y las 11 AM. Se incluyeron pacientes procedentes de

4 hospitales diferentes de Madrid, España (el Hospital Universitario de La Paz, el Hospital Infanta Sofía, el Hospital de El Tajo y el Hospital del Sureste). Todos los datos clínicos, LHD, los niveles de  $\beta 2$  microglobulina, la presencia o no de ZAP70, la citogenética y la historia clínica de aparición de infecciones y tumores se recopilaron de la historia médica electrónica. La evolución clínica de los pacientes incluidos en este estudio fue seguida durante los 60 días posteriores a la inclusión.

Todos los participantes de este estudio, pacientes y VS, firmaron el consentimiento informado. El protocolo seguido se ajusta a la propuesta de principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975 y fueron aprobadas por el Comité de Ética del Hospital Universitario de La Paz.

### **3.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.**

---

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas se obtuvieron bien de buffy coats, de sangre periférica de VS o de pacientes con LLC. En todos los casos las CMSP se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad, utilizando el reactivo Ficoll-Hypaque Plus de Amershan Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU).

Para obtener los M $\phi$ , las CMSP obtenidas se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/mL en RPMI 1640 suplementado con un 1% de antibiótico y sin suero durante 1 hora. Pasado este periodo, se aspiró el sobrenadante y se lavó 3 veces la placa con solución tampón PBS para eliminar las células no adheridas. En el caso de los buffy coats las células adheridas se dejaron en cultivo con RPMI 1640 suplementado con 1% de antibiótico y un 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) durante 16 horas antes de iniciar los experimentos; por el contrario, los experimentos de los pacientes se realizaron inmediatamente después de realizar el aislamiento con el fin de valorar las características *in vivo* de los monocitos.

En todos los cultivos se evaluó la homogeneidad de la población de M $\phi$  mediante citometría de flujo, analizando la expresión del marcador de membrana CD14. Las células adheridas expresaban el marcador en un  $(82,29 \pm 4,56 \%)$  (Media  $\pm$  Desviación Estándar;  $M \pm DE$ ). Esta metodología de aislamiento de M $\phi$  se ha utilizado en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (33; 35; 36; 46).

Los Linfocitos (L $\phi$ ) utilizados para el co-cultivo con M $\phi$  humanos se obtuvieron del sobrenadante retirado después de realizar la adherencia de los M $\phi$ . Estos L $\phi$  se congelaron en viabilidad (SFB + 10% DMSO), para su posterior uso. Una vez descongelados se dejaban en cultivo

en una alta concentración  $2 \times 10^6$  células/ml durante 3 días, momento en el se recogían del pocillo, se centrifugaban y se contaban para realizar el co-cultivo con M $\phi$  obtenidos de buffy coats. Los sobrenadantes de los cultivos de estos L $\phi$  también fueron usados en los estímulos de M $\phi$  de buffy coats.

### **3.4 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

---

Los M $\phi$  tratados con los distintos estímulos se recogieron para el análisis de distintas proteínas expresadas en superficie. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos a 4°C con el anticuerpo especificado en cada caso, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las características de los anticuerpos utilizados en este trabajo, se muestran en la tabla M1. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron las células con PBS y fueron adquiridas por citometría de flujo usando el citómetro FACS Calibur de BD Biosciences (San José, EEUU). Los datos fueron analizados utilizando el programa del Cell Quest de BD Biosciences (San José, EEUU).

#### **3.4.1. Análisis intracelular de citoquinas por citometría de flujo.**

---

Durante el último estímulo los M $\phi$  se incubaron en presencia de Brefeldina A (0.5 $\mu$ l/ml) durante 16 horas, después los M $\phi$  se recogieron y se lavaron con PBS. En primer lugar se realizó el marcaje de las proteínas extracelulares siguiendo el protocolo anteriormente detallado y después se fijaron y permeabilizaron en un solo paso con la solución FACS permeabilizing solution II de BD Biosciences (San José, EEUU) durante 15 minutos en oscuridad y temperatura ambiente, tras este periodo las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos de las citoquinas intracelulares durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente las células se lavaron nuevamente con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo.

### **3.5 LÍNEAS CELULARES USADAS.**

---

Para el modelo de LLC realizado con monocitos/macrófagos obtenidos de buffy coat, se utilizó la línea celular MEC-1. Esta línea se obtuvo mediante crecimiento espontáneo de sangre periférica de un paciente de LLC en transformación pro-linfocitoide. Comparte la mayoría de los

marcadores que poseen las células B maduras y tienen altos niveles de expresión de CD80 y CD86, fueron obtenidas de la American Type Culture (ATCC).

**Tabla M1: Listado de los Anticuerpos utilizados en este trabajo.**

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie Reconocida</i>	<i>Tipo</i>	<i>Origen</i>	<i>Compañía</i>
<b>Anti-CD14-APC</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con Allophycocyanin (APC)</i>	<i>Ratón</i>	<i>Immunostep, Salamanca, España</i>
<b>Anti-CD14-FITC</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con flouresceinisothiaocyanate</i>	<i>Ratón</i>	<i>Immunostep, Salamanca, España</i>
<b>Anti-TNF<math>\alpha</math>- APC</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con (APC)</i>	<i>Ratón</i>	<i>MiltenyiBiotec, Auburn, CA, EEUU</i>
<b>Anti-TGF<math>\beta</math>-PE</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con Phycoerythrin (PE)</i>	<i>Ratón</i>	<i>MiltenyiBiotec, Auburn, CA, EEUU</i>
<b>Anti-CD163-PE</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con (PE)</i>	<i>Ratón</i>	<i>BD Biosciences (San José, EEUU)</i>
<b>Anti-CD64-FITC</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con (FITC)</i>	<i>Ratón</i>	<i>BD Biosciences (San José, EEUU)</i>
<b>Anti-CD16-FITC</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con (FITC)</i>	<i>Ratón</i>	<i>BD Biosciences (San José, EEUU)</i>
<b>Anti-CD3-PE</b>	<i>Humano</i>	<i>Monoclonal conjugado con Phycoerythrin (PE)</i>	<i>Ratón</i>	<i>BD Biosciences (San José, EEUU)</i>

### 3.6 CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA).

Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares se valoraron mediante la utilización del Kit Cytometric Bead Array (CBA), de la casa comercial BD Bioscience (San José, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 3.7 ENSAYOS DE ELISA

Para analizar los niveles de ácido hialurónico (HA) y del Decoy receptor 3 (DcR3) presentes en el plasma de los pacientes con LLC y de los VS, se realizaron ensayos de ELISA de la casa comercial R&D (Hyaluronan DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, EEUU) y (DcR3/TNFSRF6B

DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, EEUU). Estos ensayos se realizaron en placas de poliestireno de fondo plano, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 3.8 TRATAMIENTOS.

---

Los cultivos de M $\phi$  humanos se llevaron a cabo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estables de temperatura (37°C), humedad relativa (90%) y CO<sub>2</sub> (5%).

Los M $\phi$  de los pacientes con LLC y de los VS, se mantuvieron en reposo inmediatamente después del aislamiento y se estimularon con LPS (10ng/ml) entre las 8:00 y la 11:00 de la mañana, para evitar las variaciones en la secreción de citoquinas. En los cultivos en los que se realizaría tinción intracelular, los M $\phi$  se estimularon en presencia de Brefeldina A (1 $\mu$ g/ml) durante las últimas 16 horas. Finalizado el tiempo de estímulo, se recogieron los M $\phi$  y se marcaron con los diferentes anticuerpos para su análisis mediante citometría. En todos los experimentos se mantuvo en paralelo una placa de monocitos no tratados (control).

Para valorar los niveles de expresión de los miRNAs, los M $\phi$  de pacientes con LLC y de VS, se recogieron después de 3 horas de estímulo con LPS (10ng/ml), los miRNAs se aislaron y se cuantificaron.

En los experimentos *in vitro* con M $\phi$  de buffycoats, estos se mantuvieron en cultivo durante 16 horas tras el aislamiento antes de recibir algún tratamiento. Se co-cultivaron previamente con células tumorales MEC-1 en una relación 10 M $\phi$ : 3 MEC-1 durante 5 días; pasado este tiempo las células MEC-1 se retiraron del medio, y los M $\phi$  se estimularon con LPS (10ng/ml) durante 3, 6 y 24 horas, en caso de realizar una extracción de RNA o miRNAs y 16 horas en caso de evaluar la expresión de proteínas mediante citometría de flujo. En todos los experimentos, como control de la respuesta inflamatoria, se mantuvo en paralelo una placa solo con medio en los días de co-cultivo previo, manipulada de la misma manera que el resto de placas, y que sólo recibía el estímulo final con LPS (10ng/ml). Además, como control del modelo clásico de tolerancia a endotoxinas, se mantuvo una placa en cultivo durante 5 días con LPS (10ng/ml) y para evaluar la situación basal una placa sin ningún tipo de tratamiento durante todo el experimento.

Para la generación *in vitro* en M $\phi$  naïve de TE, se realizaron dos tipos de tratamientos. i) La estimulación con el sobrenadante de L $\phi$  de LLC o de VS o ii) el co-cultivo con los L $\phi$  procedentes de

pacientes con LLC o de VS, en ambos casos obtenidos de la población no adherente en nuestro protocolo de aislamiento de M $\phi$ . Los L $\phi$  usados en estos experimentos se mantuvieron en congelación, hasta el momento de realizar el co-cultivo, se descongelaron y se mantuvieron en cultivo durante 3 días, en medio RPMI suplementado con el 10% de SFB y el 1% de antibiótico, en una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células/ml. Después de los 3 días, se recogió el sobrenadante, se centrifugó y se aplicó en una relación 10% con medio fresco como estímulo a los M $\phi$  naïve. Por otro lado, los L $\phi$  se co-cultivaron con los M $\phi$  naïve en relación 1:1 durante 3 días. Ambos pre-estímulos se mantuvieron durante 3 días, finalizado este tiempo, se retiraron del medio los L $\phi$  y el sobrenadante respectivamente. Los M $\phi$  posteriormente se estimularon con LPS (10 ng/ml) durante 16 horas, para revelar así el fenotipo tolerante. En todo momento en el experimento se mantuvo i) una placa sin ningún tipo de tratamiento como control negativo, ii) otra placa estimulada los 3 días del pre-tratamiento con LPS 10ng/ml. iii) Además, se mantuvo siempre una placa por cada paciente o VS, sin ningún tipo de pre-tratamiento y, únicamente estimulada durante las últimas 16 horas con cada uno de los L $\phi$  usados en el experimento tanto de pacientes LLC como de VS, este punto se usó como referencia de la respuesta inmune generada al realizar un co-cultivo heterólogo. De hecho, la respuesta de los M $\phi$  frente al LPS se evaluó tomando como situación basal la respuesta inmune obtenida en este punto.

### **3.9 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.**

---

La capacidad de los M $\phi$  de los pacientes con LLC y de los VS para estimular la proliferación de los linfocitos se estudió mediante un ensayo de inmunidad, siguiendo el protocolo descrito anteriormente por Hernández-Fuentes et al (70) y por Adam et al (5). Linfocitos heterólogos humanos, obtenidos de la población no adherente en nuestro protocolo de aislamiento de M $\phi$ , se marcaron con el colorante vital PKH2 (Green Fluorescence Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich). Una vez aislados los M $\phi$  de los pacientes con LLC y de los VS, se pusieron en co-cultivo con los L $\phi$  teñidos en una proporción 1M $\phi$ : 5L $\phi$  y se mantuvieron durante 5 días. Después de 5 días de co-cultivo, las células no adheridas fueron recolectadas, marcadas con anti-CD3-PE y adquiridas en citometría de flujo. Como controles para el análisis se usaron L $\phi$  marcados con CD3 sin co-cultivar con M $\phi$ . La proliferación fue cuantificada como la pérdida de intensidad de fluorescencia del colorante PKH2 en las células CD3+. La proliferación se representó como el número de veces que aumenta el porcentaje de proliferación inducido por los M $\phi$  de los pacientes con LLC frente al inducido por los M $\phi$  de los VS, tomando como 1 el porcentaje de células CD3+ que habían perdido PKH2 sin estimulación.

### ***3.10 ENSAYOS DE FAGOCITOSIS.***

---

Para la realización de los ensayos de fagocitosis, los Mφ aislados de sangre periférica de LLC y de VS se sembraron en placas de 24 pocillos en una concentración de  $10^5$  células/ml. Estos Mφ se incubaron con  $10^7$  bacterias E.coli (K-12, Molecular probes) transfectadas con la proteína GFP constitutiva, durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación se recogieron los Mφ, mediante centrifugación diferencial se retiraron las bacterias no unidas a la membrana de los Mφ. Después el pellet se incubó durante 30 minutos con lisozima (100mg/ml), a temperatura ambiente y en agitación. Una vez finalizado este proceso se lavaron en PBS y los Mφ se marcaron con CD14 APC. La fagocitosis se evaluó mediante la co-localización de las células CD14+/GFP+ en citometría de flujo.

### ***3.11 AISLAMIENTO DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.***

---

En cada uno de los tratamientos los Mφ se lavaron con PBS y se aisló el RNA total utilizando el Kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), el cual incluye tratamiento con DNasa I, para eliminar al ADN contaminante. En todos los casos se tomaron las precauciones oportunas para evitar contaminaciones con Ribonucleasas (RNAsas). La concentración y pureza del RNA se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific). Posteriormente, se realizó la transformación de 1µg del RNA a DNA complementario (DNAc) mediante retrotranscripción, utilizando para ello el kit High Capacity CDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) en un volumen final de 20µl y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### ***3.12 PCR A TIEMPO REAL.***

---

Los niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados en el presente trabajo se analizaron mediante qPCR en tiempo real utilizando el DNAc obtenido según se describe en el apartado anterior. Para la reacciones de qPCR se utilizó el kit Quatimix Easy (Biotools, Madrid, España), el fluorocromo utilizado en estas qPCRs fue Syber Green de (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Todos los cebadores específicos utilizados para cada gen se detallan en la tabla M2. Todos fueron

sintetizados, desalados y purificados mediante HPLC por BonsaiBiotech (Alcobendas, Madrid). Para confirmar la especificidad de los cebadores, se analizaron los perfiles de melting o desnaturalización. Estos perfiles se determinaron manteniendo la reacción a 80°C durante 10 segundos y después, calentando la reacción hasta 95°C en una tasa de calentamiento de 0,1°C/segundo. A lo largo de este proceso se midió la fluorescencia emitida. Con este análisis se verificó que para cada par de cebadores se producía un único producto de amplificación. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio (0,5 ug/ml) y se analizaron por transiluminación ultravioleta. En todos los casos se comprobó que para cada par de cebadores el producto de amplificación era una única banda del tamaño esperado.

**Tabla M2: Listado de los cebadores usados en el trabajo**

<i>Gen</i>	<i>Cebador Sentido (5'→3')</i>	<i>Cebador Antisentido (3'→5')</i>	<i>Tm</i>
<b><i>TNFα</i></b>	AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	TCCACATCTGCTGGAAGGTGG	<b>62</b>
<b><i>IL-6</i></b>	CAAAGAATTAGATGCAATAA	GCCCATTAACAACAACAATCTG	<b>54</b>
<b><i>IL-1β</i></b>	GGATATGGAGCAACAAGTGG	ATGTACCAGTTGGGGAAGTGG	<b>57</b>
<b><i>CCL20</i></b>	GCAAGCAACTTGACTGCTG	TGGGCTATGTCCAATTCCAT	<b>60</b>
<b><i>IRAK-1</i></b>	GCACGCAGCTTGACGCTG	TCACCTCTGCTGGAACGTGG	<b>62</b>
<b><i>IRAK-M</i></b>	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA	GCATTGCTTATGGAGCCAAT	<b>62</b>
<b><i>TGFβ</i></b>	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC	<b>62</b>
<b><i>TRAF6</i></b>	CTGAATGATGGCATGCGCGC	TGGGATTCCATTGCGCGCCC	<b>58</b>
<b><i>VEGF</i></b>	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	GCAGCGTGGTTTCTGTATC	<b>60</b>
<b><i>CCL18</i></b>	CCCTCCTTGTCCTCGTCTG	GCTTCAGGTCGCTGATGTATT	<b>62</b>
<b><i>MIF</i></b>	CTCTCCGAGCTCACCCAGCAG	CGCGTTCATGTCGTAATAGTT	<b>60</b>
<b><i>β-Actina</i></b>	GTCCACCTTCCAGCAGATGT	CATCTTCACCGTTCCAGTTT	<b>62</b>

La cuantificación del DNA copia (cDNA) de cada uno de los genes de interés se llevó a cabo utilizando una curva estándar de siete puntos específica para cada gen. Para ser aceptadas como válidas los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) de cada curva fueron siempre >0.98. Además en cada reacción de qPCR se incluyó un punto de la curva estándar. El programa con el que se



analizaron cada uno de los genes consistió en 45 ciclos con una temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) específica para cada par de cebadores, precedida por un paso de desnaturalización y activación de la polimerasa de 5 minutos a 95°C. Los resultados obtenidos para cada uno de los genes analizados se normalizaron con respecto a la expresión de la  $\beta$ -actina. Esta metodología ha sido usada por nuestro grupo en trabajos anteriores (33; 58; 175).

### ***3.13 AISLAMIENTO DE LOS miRNAs Y SÍNTESIS DE cDNA.***

---

Después de cada uno de los tratamientos los M $\phi$  se lavaron con PBS, se levantaron de las placas y se aislaron positivamente las células que expresaban el marcador CD14, mediante unas bolitas magnéticas, Dynabeads CD14 de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). Una vez obtenida la población pura de M $\phi$ , estos se lisaban y se separan de las bolitas magnéticas para el posterior aislamiento de los miRNAs mediante el kit RNAqueous Micro Total RNA isolation kit de Ambion (Austin, TX, EEUU). La concentración y pureza del RNA se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific). A continuación se realizó la transformación de 10ng del RNA a DNA complementario (DNAc) mediante retro-transcripción, para ello se utilizó el TaqMan Micro RNA Assays de Applied Biosystem (Foster City, EEUU), que emplea un sistema de tallo-lazo para un objetivo específico haciendo posible la retro-transcripción a pesar del pequeño tamaño que poseen los miRNAs maduros, por lo tanto de una misma muestra se realizaban tantas reacciones de retro-transcripción como miRNAs se quisieran estudiar.

### ***3.14 PCR A TIEMPO REA LDE miRNAs.***

---

Los niveles de expresión de cada uno de los microRNAs estudiados se analizaron mediante qPCR en tiempo real utilizando el DNAc obtenido según se describe en el apartado anterior. Para la reacciones de qPCR se utilizó el kit TaqMan Universal MasteMix II (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y el termociclador Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para el estudio de la expresión de cada uno de los microRNAs de este trabajo se usó su correspondiente TaqMan MicroRNA Assay de Applied Biosystem (Foster City, EEUU). El programa con el que se analizaron cada uno de los microRNAs consistió en 45 ciclos con una temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de 95°C durante 10 segundos y una temperatura de anillamiento y extensión de 60°C durante 1 minuto, en los que se recoge la fluorescencia emitida por las sondas TaqMan, precedida por un paso de desnaturalización y activación de la polimerasa

de 10 minutos a 95°C. Para todos los microRNAs se realizaron tres replicas de cada uno de las reacciones de qPCR.

La cuantificación del cDNA de cada uno de los microRNAs de interés se llevo a cabo mediante la valoración de los distintos puntos de corte, del inglés, crossingpoint (Cp). Los resultados obtenidos para cada uno de los microRNAs analizados se normalizaron con respecto a la expresión del microRNA RNU24.

### ***3.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.***

---

Para cada experimento se realizó un mínimo de 3 experimentos independientes. Los datos obtenidos están expresados como Media $\pm$ Desviación estándar (M $\pm$ DE). Las comparaciones estadísticas se han realizado mediante el test de la t de student en los casos en los que se comparaban las diferencias entre dos muestras. Sin embargo en los casos en los que se comparaban diferencias entre más de dos muestras mediante una ANOVA de una vía y el post-tets de Dunnet para comparaciones múltiples. Se consideraron como significativas las diferencias con un p-valor <0.05.

Por otro lado, para tratar de predecir la evolución de los pacientes de LLC. Se realizó un análisis mediante curvas ROC (del inglés Receiver operating characteristic curve)(121) para estudiar la relación existente entre la capacidad de los M $\phi$  aislados de los pacientes para expresar en membrana las moléculas presentadoras de antígeno de clase II, HLA-DQ y HLA-DR en respuesta al LPS y el desarrollo o no de infecciones bacterianas en el transcurso de la enfermedad.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prims 5.0 (GraphPad, San Diego, EEUU)

## **4. RESULTADOS**



## 4.1 CARACTERÍSTICAS Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

Para estudiar la respuesta inmune innata en la LLC se reclutaron 70 pacientes y 20 voluntarios sanos (VS) de edad y sexo similares.

**Tabla R1: Principales características de los pacientes de LLC reclutados para el estudio.**

Parámetros	Valores*
<b>PACIENTES</b>	
<i>Número de Pacientes</i>	70
<i>Edad (años)</i>	71±11,65
<i>Sexo (Hombre/Mujer)</i>	H: 57% (40) ; M: 43% (30)
<i>Diagnóstico</i>	Leucemia Linfática Crónica
<i><u>Estadio Binet</u></i>	
A	86% (60)
B	3% (2)
C	11% (8)
<i>ZAP70</i>	28,5 % (20)
<i>LDH &gt; 250 U/L</i>	4% (3)
<i>B<sub>2</sub>microglobulina &gt;2,5 mg/L</i>	37,1%(26)
<i><u>Citogenética</u></i>	
<i>Del13q</i>	23% (16)
<i>Del17p</i>	3% (2)
<i>TRISOMIA 12</i>	7% (5)
<i>OTRAS**</i>	6% (4)
<i>NORMAL***</i>	43% (30)
<i>ND ****</i>	24% (17)
<i>Infecciones</i>	27,1%(19)
<i>Tumores secundarios</i>	5,7%(4)
<i>Decesos</i>	5,7%(4)
<b>VOLUNTARIOS SANOS</b>	
<i>Número</i>	20
<i>Edad (años)</i>	68±12
<i>Sexo (Hombre/Mujer)</i>	H: 60% (12) ; M: 40% (8)
<i>Infecciones</i>	0% (0)
<i>Tumores secundarios</i>	0%(0)
<i>Decesos</i>	0%(0)

\* Variables continuas; Media ± Desviación estándar; variables categóricas % (números absolutos).

\*\* Del11q, p5.; \*\*\*Cariotipo normal; \*\*\*\* No datos.

Las características clínicas más relevantes, tales como el estadio clínico, medido por el sistema Binet, los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), los valores de  $\beta 2$  microglobulina, la presencia de la proteína Zap70 y el estatus citogenético se recogen en la Tabla R1. También están detallados los parámetros demográficos de los 20 VS incluidos en el estudio.

En el seguimiento de la evolución clínica de los pacientes, se encontró que 19 (27%) pacientes desarrollaron una infección en los 60 días posteriores a su inclusión en el estudio y que durante el año siguiente 4 (6%) pacientes se diagnosticaron con algún tipo de tumor secundario y 4 (6%) de los pacientes fallecieron.

No se encontró ningún tipo de asociación entre los niveles de gammaglobulina en los pacientes y la aparición de infecciones ( $p= 0.365$ ). Siete (36.8%) de los 19 pacientes con deficiencia en sus niveles de inmunoglobulinas desarrollaron infecciones mientras que de los 52 pacientes con niveles normales de inmunoglobulinas 12 (24%) desarrollaron infecciones (Tabla R2). La cohorte de pacientes con LLC incluidos en este estudio no recibieron ningún tipo de tratamiento durante los 60 días posteriores a su inclusión en el estudio.

**Tabla R2: Hipogammaglobulinemia e incidencia de infecciones en pacientes con LLC.**

<b>Inmunoglobulinas</b>	<b>Número de pacientes (%)<sup>§</sup></b>	<b>Pacientes con infecciones<sup>#</sup> (%)<sup>&amp;</sup></b>
<b>IgM&lt;*</b>	14 (20%)	5(26,3%)
<b>IgG&lt;**</b>	1(1,4%)	0
<b>IgA&lt;***</b>	0	0
<b>IgM e IgG&lt;</b>	2(2,8%)	0
<b>IgM e IgA&lt;</b>	0	0
<b>IgG e IgA&lt;</b>	0	0
<b>IgM, IgG e IgA&lt;</b>	2(2,8%)	2(10,5%)
<b>Niveles normales****</b>	51(72,8%)	12(63, %)

<sup>#</sup> Pacientes que han desarrollado infecciones en los 60 días posteriores a su inclusión en el estudio.

<sup>§</sup> Porcentaje calculado a partir del número total de pacientes (n=70)

<sup>&</sup> Porcentaje calculado en base al número total de pacientes con infección (n=19).

\* Valores de IgM< 50mg/dL

\*\* Valores de IgG< 650mg/dL

\*\*\* Valores de IgA< 40mg/dL

\*\*\*\* Los valores normales de IgM (50-300mg/dL), IgG (650-1600 mg/dL) y de IgA (40-350 mg/dL).

De este modo, según nuestros datos, no podemos afirmar que la causa de las infecciones registrada para nuestra cohorte sea únicamente debido a la hipogammaglobulinemia. En cambio, cuando observamos la clínica de los pacientes sí observamos un incremento en la tasa de infecciones que podría deberse a algún tipo de afectación en el sistema inmune, motivo por el cual se decidió estudiar el fenotipo de los Mφ de pacientes con LLC.

## 4.2 LOS Mφ CIRULANTES DE PACIENTES CON LLC PRESENTAN UN ESTADO DE TE.

---

### 4.2.1. *Caracterización del perfil inflamatorio.*

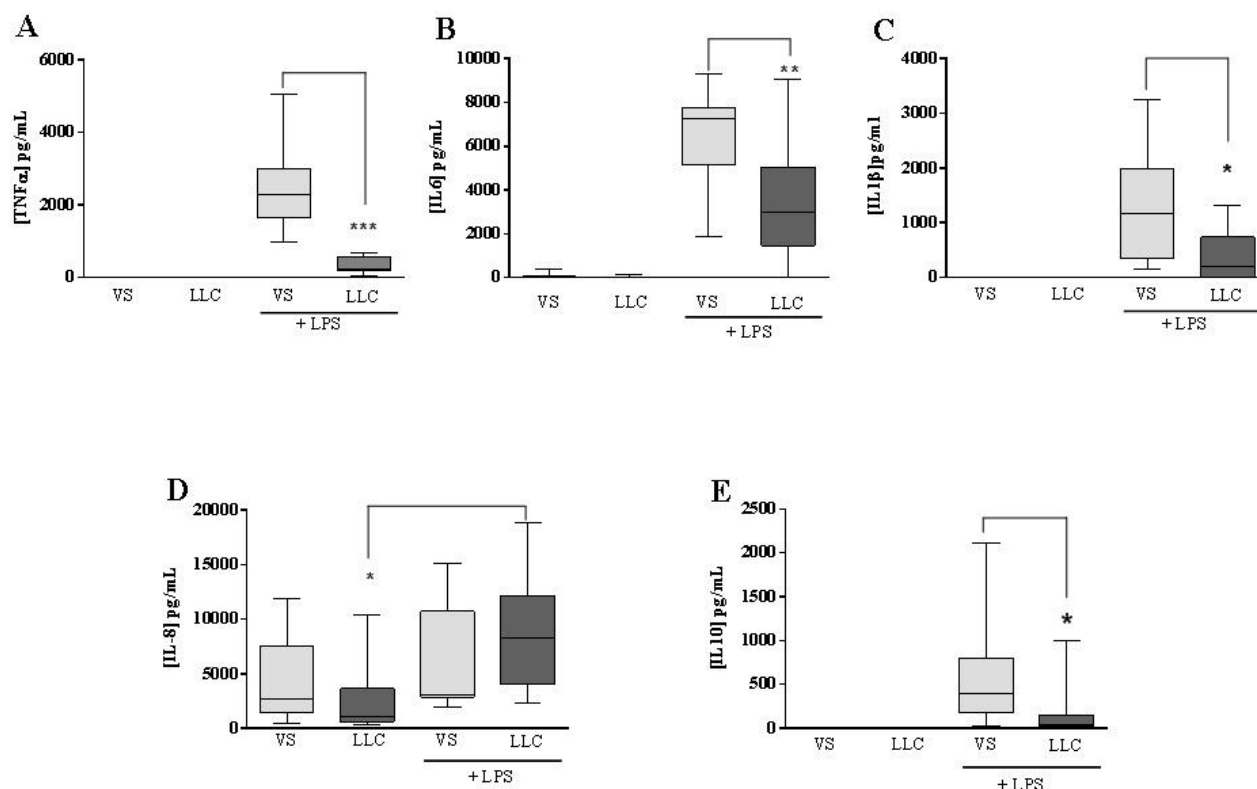
---

Una de las características más importante que poseen los Mφ es la plasticidad que presentan para responder a los distintos estímulos que encuentran en el ambiente. La secreción de diferentes citoquinas y quimioquinas se encuentra entre una de sus formas de respuesta, estas moléculas son capaces de modular la respuesta inflamatoria de las otras células del sistema inmune y la de los propios Mφ (19; 21; 23).

Tal y como comentamos en la introducción, los Mφ M1 se caracterizan por presentar una alta expresión de citoquinas pro-inflamatorias: TNFα, IL1β e IL6. Por el contrario las diversas formas de Mφ M2 generalmente presentan un fenotipo con baja expresión de TNFα, IL1β e IL6 y con una alta expresión de citoquinas anti-inflamatorias como IL10 y TGFβ entre otras.

Se analizó el perfil inflamatorio de los Mφ circulantes de los pacientes con LLC y de los VS. Para ello se aislaron los Mφ mediante gradiente ficoll y se cultivaron a una densidad de  $3 \times 10^6$  células, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Para evaluar la respuesta inflamatoria de los Mφ de los pacientes estos se estimularon *ex vivo* con LPS (10ng/ml) durante 24 horas. Después de la estimulación se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se procesaron mediante la técnica del CBA. Se evaluaron los niveles de producción de TNFα, IL1β, IL6, IL8 e IL10 de forma basal y en respuesta al estímulo.

En la figura R1 se observa que los niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias,  $\text{TNF}\alpha$  (A), IL6 (B) e IL1 $\beta$  (C) son significativamente menores en los M $\phi$  de los pacientes con LLC que en los M $\phi$  de los VS expuestos al LPS. Únicamente se observa un ligero incremento en la secreción de la IL6, nunca superior a los niveles de secreción de los VS. Estos datos sugieren una incapacidad en los M $\phi$  de los pacientes con LLC para producir citoquinas inflamatorias en respuesta al LPS.

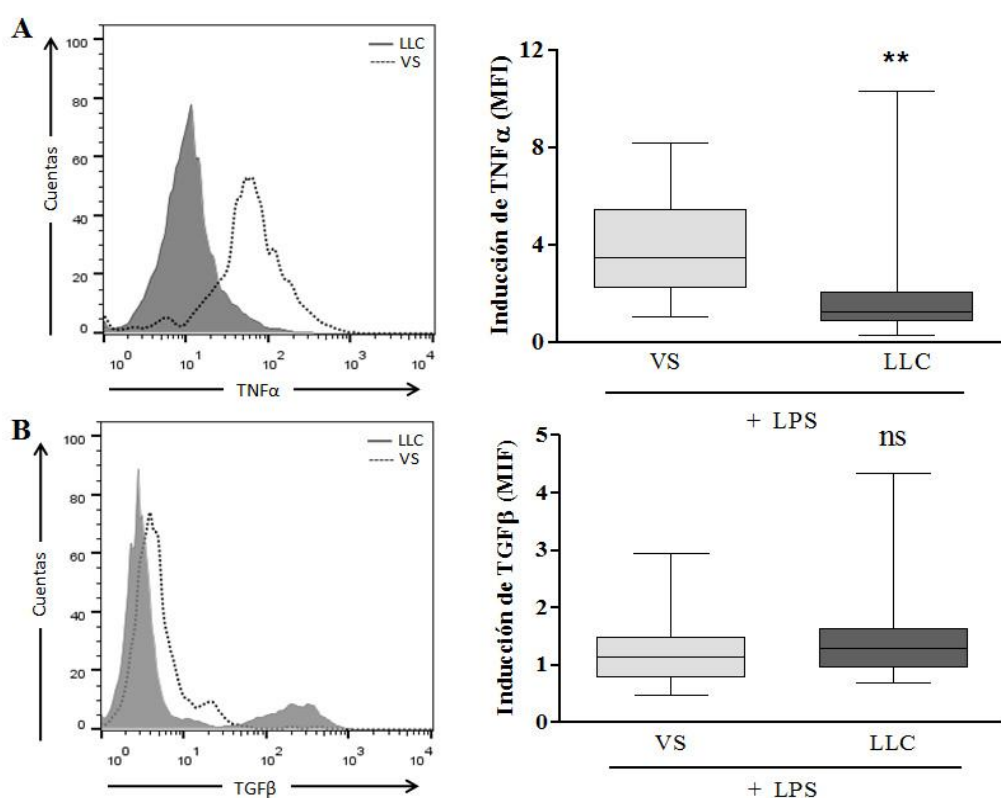


**Fig. R1. Los M $\phi$  de los pacientes con LLC no presentan una respuesta inflamatorio en la secreción de citoquinas en respuesta al LPS.** Representación de los niveles de expresión de las citoquinas inflamatorias obtenidos en los sobrenadantes de los M $\phi$  aislados de VS (cajas gris claro; n=20) y de los pacientes con LLC (cajas gris oscuro; n=70). En todos los casos se ha representado la M $\pm$ DE de los niveles de secreción de las citoquina  $\text{TNF}\alpha$ (A), IL6 (B), IL1 $\beta$ (C), IL8 (D) e IL10 (E) en situación basal y después de 24horas de estimulación con LPS (10ng/ml).Las comparaciones estadísticas están realizadas mediante el análisis no paramétrico U de Mann Withney para evaluar la respuesta de los VS estimulados con LPS frente a la de los pacientes con LLC (\* p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001).

Otras citoquinas como la IL8 y la IL10 fueron analizadas. Los niveles de producción de IL8 (Fig. R1D) no presentan diferencias significativas entre los VS y los pacientes en su estado basal y tampoco en respuesta al estímulo con LPS. Sólo se observan diferencias significativas entre los M $\phi$  de pacientes con LLC estimulados con LPS con respecto a la producción basal. En el caso de la IL10, una citoquina clásicamente descrita como anti-inflamatoria (125), los M $\phi$  de los



pacientes con LLC, estimulados con LPS, presentaron niveles significativamente menores en comparación con los obtenidos de los VS. El estímulo que genera el fenotipo de TE modula el tipo de respuesta en los M $\phi$  y los diferentes M2 pueden compartir algunas características clásicamente descritas para este tipo de células. Sin embargo, es importante destacar que el fenotipo pro-inflamatorio y tolerante representan extremos del continuo de estados de activación que se encuentran *in vivo* (23; 79; 115; 130), esto puede explicar los resultados obtenidos en la producción de IL10 en los M $\phi$  de los pacientes con LLC. En cualquier caso la actividad anti-inflamatoria de la IL10 no siempre es imprescindible para el desarrollo de la TE, de hecho ratones Knockout para la IL10 desarrollan de igual manera un fenotipo tolerante cuando se exponían en dos ocasiones sucesivas al LPS (17).



**Fig. R2. Expresión de TNF $\alpha$  y TGF $\beta$  en M $\phi$ .**

**(A)** Histograma de la expresión de TNF $\alpha$  en VS (línea negra punteada) y en los pacientes con LLC (relleno gris). A la derecha se muestra la representación del análisis estadístico (M $\pm$ DE) de la expresión de TNF $\alpha$  en los VS (cajas gris claro; n=20) y de los pacientes con LLC (cajas gris oscuro; n=70). **(B)** Histograma de la expresión de TGF $\beta$  en los VS (línea negra punteada) y pacientes con LLC (relleno gris). A la derecha se ha representado el análisis estadístico (M $\pm$ DE) de la expresión de TGF $\beta$  en los VS (cajas gris claro; n=20) y en los pacientes con LLC (cajas gris oscuro; n=70). En ambos casos la inducción de la expresión se calculó como el número de veces que aumentaba o disminuía la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las citoquinas con respecto a la registrada basalmente en respuesta al LPS (10ng/ml; durante 16 horas en presencia de Brefeldina A (0,5 M)). Se realizó un análisis estadístico no pareado, no paramétrico (test U de Mann-Whitney) ns = no significativo; \*\* p < 0.01.

La respuesta inflamatoria de los Mφ frente al LPS también se evaluó mediante tinción intracelular de TNFα y de TGFβ, esta última descrita como una quimioquina anti-inflamatoria (117). Para realizar estos experimentos los Mφ de los pacientes con LLC y los Mφ de los VS se aislaron y se sembraron utilizando el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Después se estimularon con LPS (10ng/ml) durante 16 horas en presencia de brefeldina A (0,5M), garantizando así la acumulación de las proteínas producidas en el citoplasma.

Los resultados obtenidos reflejan que los Mφ de los pacientes producen cantidades significativamente menores de TNFα que los Mφ de los VS en respuesta al LPS (Fig. R2A). Por el contrario la expresión de TGFβ sólo mostró un ligero incremento en los Mφ de los pacientes con LLC frente al número de veces que se induce la expresión en los VS  $M \pm DE$  ( $1,5 \pm 0,9$  en los Mφ de los pacientes vs  $1,2 \pm 0,55$  en los Mφ de los VS;  $p=0.19$ ) (Fig. R2B).

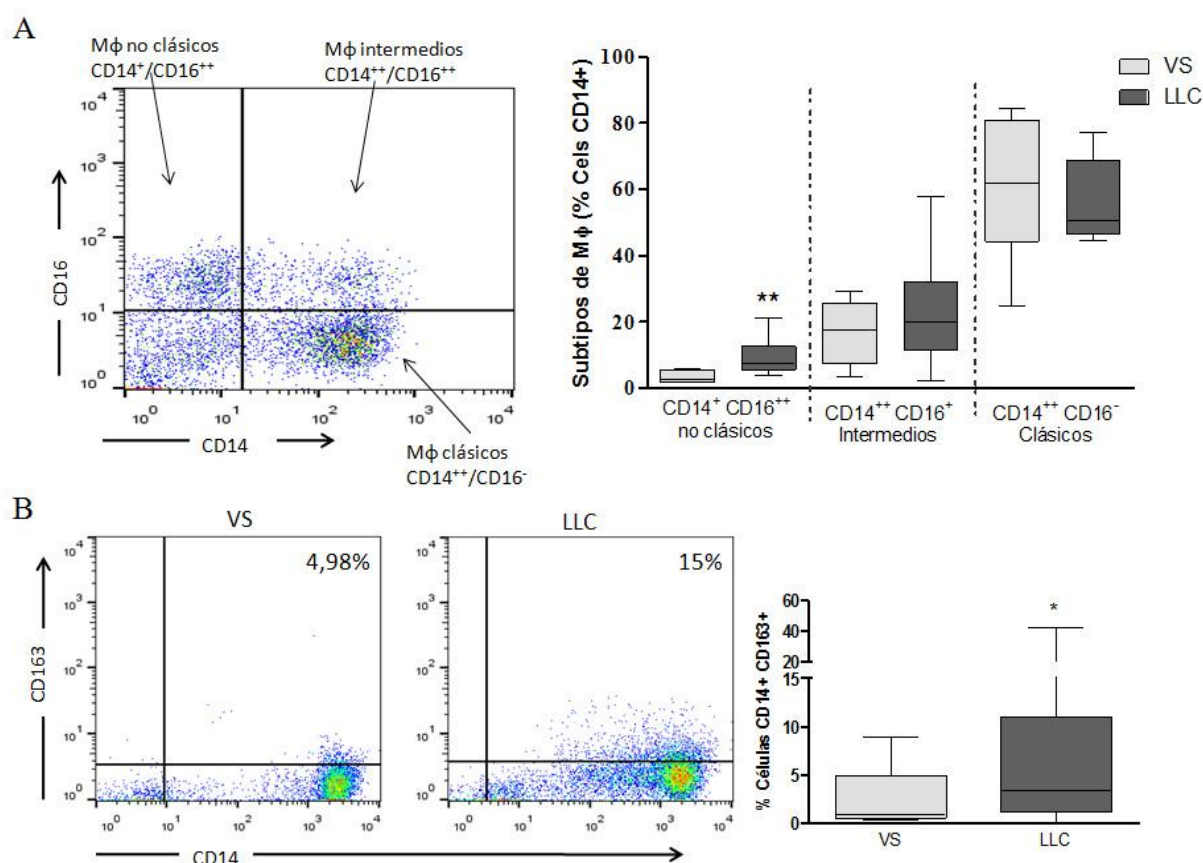
#### **4.2.2. Marcadores fenotípicos en los Mφ de pacientes con LLC.**

Dado que los Mφ circulantes son una población dinámica se pueden clasificar en diferentes subtipos de activación, dependiendo del tipo de respuesta y los marcadores de membrana que presenten. Cada subtipo de Mφ posee un fenotipo funcional distinto, y es la acumulación de uno frente a otro lo que puede definir el tipo de respuesta inmune.

El receptor FcγRIII o CD16 pertenece a la familia de los receptores Fc y se caracteriza por aumentar la capacidad fagocítica de algunas células del sistema inmune (137). Este receptor se encuentra expresado de forma diferencial en los Mφ. De hecho, en pacientes con sepsis se ha descrito un aumento de Mφ circulantes CD16<sup>+</sup> (84).

En nuestra cohorte de pacientes se analizó, mediante citometría de flujo, la expresión del marcador CD16. Para ello, se dividió la población de Mφ circulantes en base a la expresión del marcador CD14, uno de los receptores del LPS ampliamente expresado en Mφ humanos, y a la expresión de CD16 en tres subtipos: monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>), monocitos no clásicos (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup>) y monocitos intermedios (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>++</sup>) (Fig. R3A). El subtipo de Mφ principalmente representado fue el clásico, con un  $60.6\% \pm 20.9$  y un  $56.35\% \pm 12.06$  del total de los Mφ en los VS y en los pacientes respectivamente; los Mφ de subtipo intermedios estaban representados en un  $17,07\% \pm 9,5\%$  en los VS y un  $22,96\% \pm 5,26\%$  en los pacientes. La población de Mφ no-clásico, CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>++</sup> se encontró significativamente incrementada en los pacientes con LLC con respecto a los VS ( $9.1\% \pm 4,8$  frente a  $3.45\% \pm 1,8$ ;  $p=0,0023$ ). Resultados similares con LLC (111).

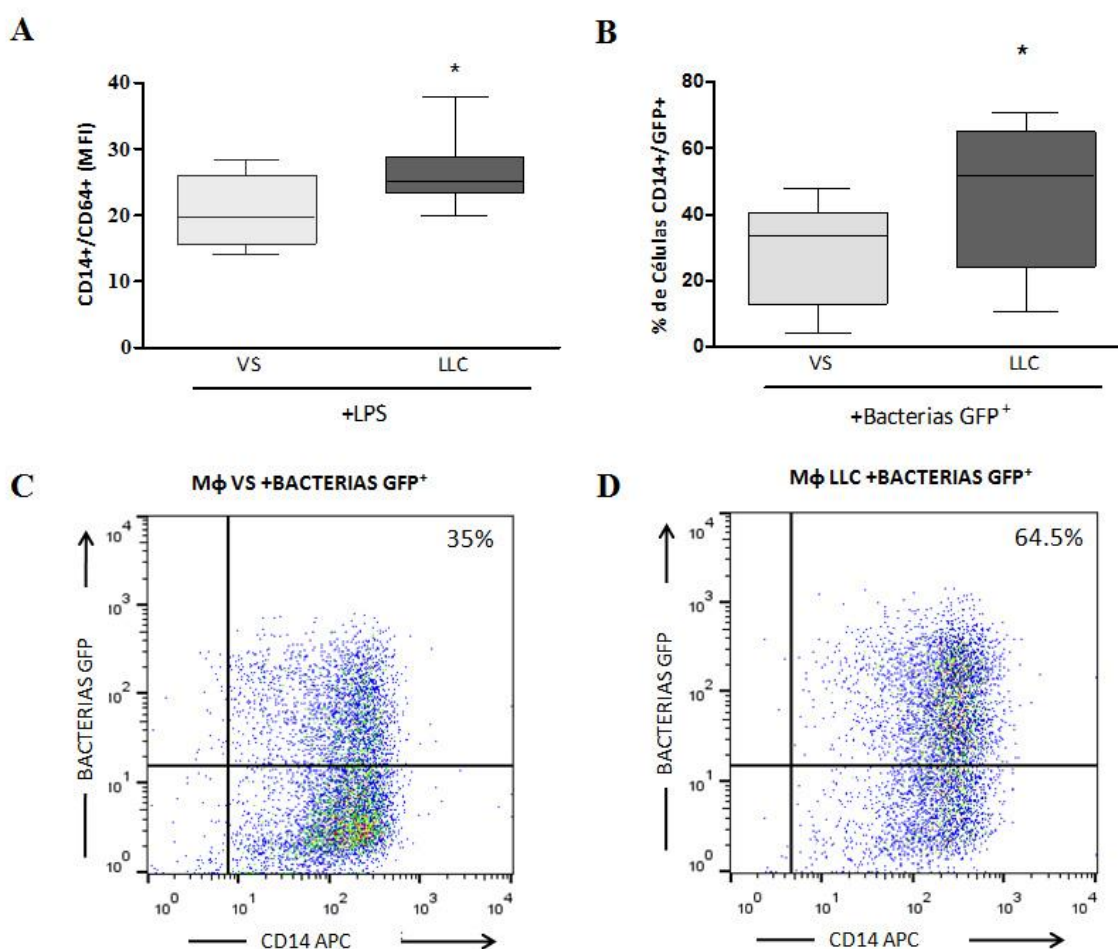
El marcador CD163, un receptor scavenger para los complejos de hemoglobina-haptoglobina (91), se induce en una subpoblación de M $\phi$  polarizados en respuesta a factores anti-inflamatorios como la IL4, la IL10 o los corticoesteroides (28). Los M $\phi$  que presentan este marcador en membrana generalmente desarrollan participan en la resolución de la inflamación y la reparación del daño tisular (59; 123). Un incremento en su expresión se ha asociado con comportamientos más agresivos en diferentes tumores y una menor producción de TNF $\alpha$  (118; 146; 190). El análisis de los M $\phi$  circulantes en los pacientes con LLC, mediante citometría de flujo, mostró un mayor porcentaje de M $\phi$  CD163<sup>+</sup> en los pacientes con LLC comparado con el porcentaje de M $\phi$  CD163<sup>+</sup> encontrados en los VS (M $\pm$ DE; 8,68 $\pm$ 11,4% frente a 2,35 $\pm$ 3,7% respectivamente; p=0,039) (Fig. R3B).



**Figura R3: Marcadores de superficie.**

**(A)** Ejemplo de la distribución de poblaciones en un paciente con LLC de los M $\phi$  en base a su expresión CD14/CD16. A la derecha se representa el análisis estadístico donde (M $\pm$ DE) en los pacientes con LLC (cajas grises n=70) y en los VS (cajas grises claro n=10) **(B)** Gráficos Dot blot del porcentaje de células CD14<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> en VS y en pacientes con LLC, a la izquierda se encuentra la representación del análisis estadístico, los VS (cajas gris claro n=10) LLC (cajas gris oscuro n=70). \*p<0.05; \*\*p<0.01. En todos los casos el análisis de los marcadores se realizó en condiciones basales, comparando los pacientes con LLC frente a los VS mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Con el objeto de caracterizar mejor los M $\phi$  circulantes de los pacientes con LLC, se evaluó la expresión del receptor Fc-gamma1 (Fc $\gamma$ 1) CD64, descrito como un marcador de fagocitosis en los M $\phi$ (60). Diversos trabajos han relacionado la sobre-expresión de este receptor con el desarrollo de un perfil de tolerancia a endotoxinas y una mayor capacidad fagocítica de bacterias Gram-negativas (33). El análisis, mediante citometría de flujo, de la expresión de CD64 mostró que los M $\phi$  circulantes de los pacientes con LLC presentan un incremento significativo en la expresión de este receptor cuando se estimulan con LPS, comparado con la expresión en observada en M $\phi$  de los VS (Intensidad media de fluorescencia; MFI de 26,25 $\pm$ 4,7 en los M $\phi$  de los pacientes frente a una MFI 20,56 $\pm$ 5,6 en los M $\phi$  de los VS; p=0,043) (Fig R4A).



**Fig. R4. Expresión del marcador de membrana CD64 y capacidad fagocítica en M $\phi$ .**

**(A)** Expresión del marcador CD64 en M $\phi$  circulantes de VS (cajas gris claro; n=20) y en M $\phi$  de los pacientes con LLC (cajas gris oscuro n=70). **(B)** La capacidad fagocítica se representa como el porcentaje de los M $\phi$  CD14<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> en los VS (cajas gris claro, n= 15) frente a los pacientes con LLC (caja gris oscuro, n=40). Dot Blots representativos del porcentaje de M $\phi$  CD14<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>, en VS **(C)** y en los pacientes con LLC **(D)**. El análisis estadístico se realizó comparando mediante un análisis no paramétrico U de Mann-Whitney \* p<0.05.

A continuación, puesto que el incremento en la expresión de CD64 se ha relacionado con un aumento en la fagocitosis, analizamos la capacidad fagocítica de los Mφ de los pacientes con LLC. Para ello, los Mφ se sembraron en placa y se estimularon con bacterias Gram-negativas (E.coli K-12, Molecular probes), en una relación 1: 100 (Mφ: bacterias). Estas bacterias expresaban de forma constitutiva la proteína verde fluorescente GFP (del inglés Green Fluorescent Protein). Tras 1 hora de incubación las bacterias que no habían sido fagocitadas por los Mφ se retiraron mediante centrifugación diferencial. Para eliminar las bacterias unidas a la membrana de los Mφ, estos se trataron con lisozima (1mg/ml) durante 30 minutos. Finalmente para poder cuantificar la fagocitosis los Mφ se marcaron con CD14 y se contabilizó el porcentaje de células CD14<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> en los pacientes y en los VS. Los Mφ de los pacientes con LLC presentaron una mayor capacidad fagocítica que los Mφ de los VS, con un 45,37% ± 20,27% de células CD14<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> en los pacientes frente a un 30,31% ± 14,34% en los VS, p=0,033 (Fig. R4B).

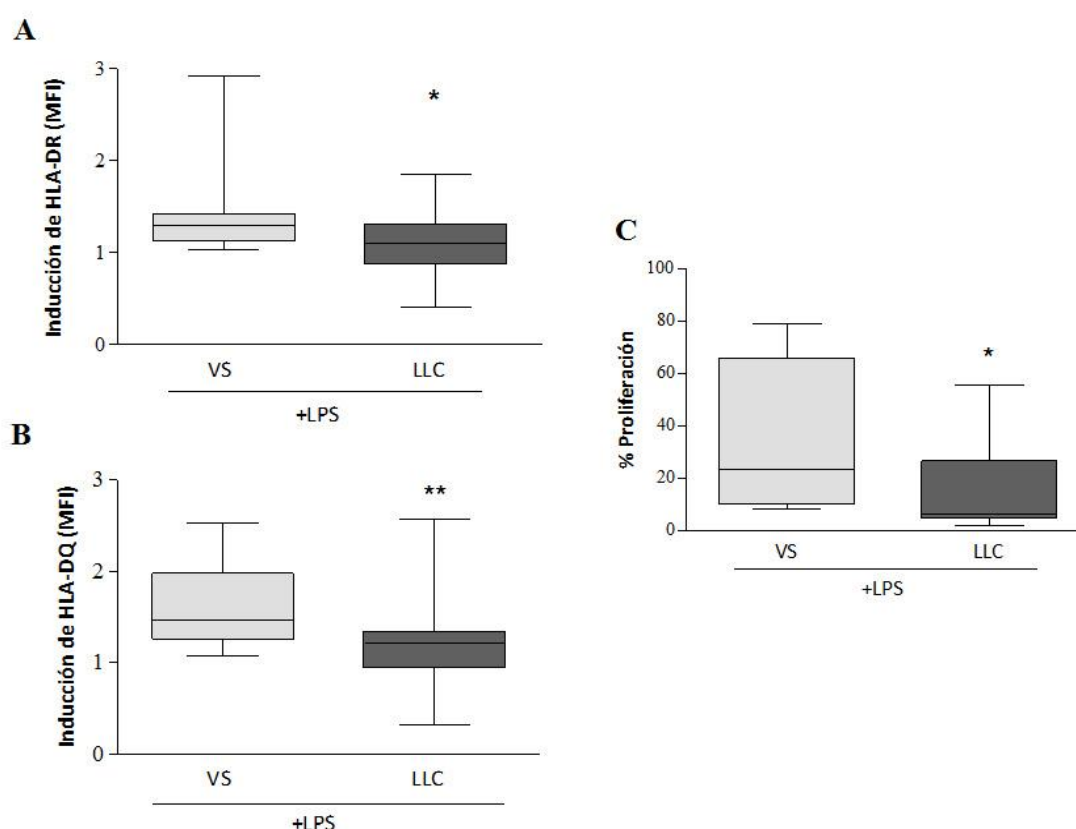
Por otro lado, y a pesar del aumento en la capacidad fagocítica, en numerosos trabajos se ha demostrado una disminución en la capacidad para la presentación antigénica de los Mφ con un fenotipo TE(33; 60; 74; 125). Una reducida expresión de las moléculas del MHC de clase II, HLA-DQ y HLA-DR se ha relacionado con esta incapacidad para la presentación antigénica que se observa en los Mφ TE presentes en diversas patologías como la sepsis, la Fibrosis Quística, el cáncer o el Síndrome Coronario Agudo (33; 46; 47; 175). Por este motivo, se estudiaron los niveles de expresión, en los Mφ aislados de los pacientes con LLC y de los VS, de HLA-DQ y HLA-DR, en respuesta al LPS.

El análisis de los niveles de expresión de estas dos moléculas, obtenidos mediante citometría de flujo, se representó en función del número de veces que aumenta o disminuye su expresión en respuesta al LPS (10ng/ml; 16 horas). Por su parte, la inducción se valoró como el número de veces que aumenta o disminuye la expresión frente a los niveles basales de cada individuo. En la Fig. R5, se observa que en la membrana de los Mφ de VS presentan una importante inducción en la expresión de HLA-DQ y de HLA-DR en respuesta al LPS, mientras que estas moléculas presentan una expresión significativamente menor en la membrana de Mφ de pacientes con LLC.

Los patrones de expresión de HLA-DQ y de HLA-DR obtenidos se corresponden con datos publicados previamente, en los que se ha encontrado una importante correlación entre una mayor presencia de Mφ CD14<sup>+</sup> /HLA-DR<sup>lo/neg</sup> y un mal pronóstico(64; 73; 188). Por ejemplo, en pacientes con cáncer de pulmón de células no-pequeñas se ha comprobado que un alto número de Mφ CD14<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>lo/neg</sup> se relaciona con metástasis extra-torácica y con una peor respuesta a la quimioterapia (73). También se ha descrito una relación entre la presencia de un mayor número de este tipo de Mφ en pacientes con LLC y una disminución en el tiempo de progresión

de esta enfermedad, acortando el periodo que permanecen sin tratamiento ni complicación alguna (64). Estos resultados, en conjunto corroboran la importancia de este fenotipo en la inmunosupresión que presentan pacientes de distintas patologías.

Una de las formas de activación de la respuesta inmune adaptativa es mediante la presentación antigénica. Los M $\phi$  no son únicamente células efectoras de la respuesta inmune innata, sino que también están involucrados en el inicio y en la regulación de la respuesta adaptativa a través de la presentación antigénica y otros mecanismos. (33; 70).



**Fig. R5. Expresión de HLA-DQ, HLA-DR y presentación antigénica.**

Análisis estadístico de la expresión de HLA-DQ (**A**) y de HLA-DR (**B**) representado como el número de veces que su expresión se induce o disminuye en respuesta al estímulo con LPS (10ng/ml; 16h) con respecto a los niveles basales registrados en los M $\phi$  control (sin estimular). Se comparó la expresión producida en los VS (cajas gris claro; n=20) frente a los M $\phi$  de los pacientes con LLC (cajas gris oscuro; n=70). (**C**) Análisis estadístico de la proliferación de L $\phi$  heterólogos humanos sanos co-cultivados con M $\phi$  de VS (cajas gris claro n=10) y M $\phi$  de pacientes con LLC (cajas gris oscuro, n=30). Ambos estimulados con LPS (10ng/ml; 24h). Los resultados están representados como el porcentaje de proliferación (M $\pm$ DE) con respecto a los M $\phi$  sin estimular. El análisis estadístico se realizó utilizando el test no paramétrico U de Man-Withney. \*p<0.05;\*\* p < 0.01.

En este trabajo se estudió la capacidad de los M $\phi$  de los pacientes para inducir la proliferación de linfocitos T. Para el desarrollo de estos experimentos, M $\phi$  de los pacientes y de VS se co-cultivaron con L $\phi$  heterólogos procedentes de otros individuos sanos que fueron

obtenidos de la población no adherente descartada en el protocolo de purificación de Mφ. Los Lφ heterólogos se marcaron con el colorante de unión a membrana PKH2 green (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en co-cultivo con los Mφ de los pacientes o de los VS durante 5 días. La proliferación se evaluó mediante citometría de flujo como la pérdida de intensidad de fluorescencia verde (PKH2 green) en la población CD3+. Los resultados representan el porcentaje de proliferación con respecto a aquellos linfocitos no expuestos a monocitos (Fig. R5C). Los resultados obtenidos demuestran que los Mφ de pacientes con LLC presentan una menor capacidad para expresar en membrana las moléculas HLA-DQ y HLA-DR y, como consecuencia, inducen una menor proliferación de los linfocitos T, indicando que el fenotipo de los Mφ aislados de los pacientes con LLC es muy similar al observado en los Mφ TE.

### 4.3 VALOR PREDICTIVO DE HLA-DR EN LA LLC.

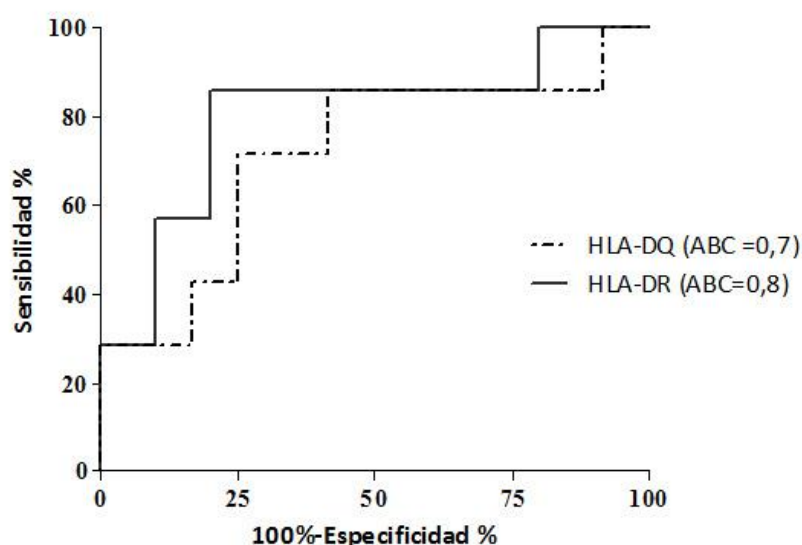
---

El conjunto de resultados obtenidos en los Mφ circulantes aislados de sangre periférica de los pacientes con LLC denota que estos Mφ se encuentran en un estado refractario o de tolerancia. Además, este fenotipo también se ha visto reflejado en la clínica de estos pacientes, puesto que presentan una alta tasa de infecciones secundarias. En este estudio se ha establecido una relación entre la incapacidad de los Mφ de los pacientes para expresar HLA-DR en su membrana y un incremento en la tendencia de la aparición de infecciones.

Para valorar la tasa de infecciones en los pacientes se realizó un seguimiento durante los 60 días posteriores a su inclusión en el estudio. De un total de 70, 19(27,91%) pacientes desarrollaron algún tipo de infección en este periodo, en la mayoría de los casos se trató de infecciones respiratorias o infecciones urinarias de repetición. En sólo un caso de los 19 la infección acabó causando la muerte del paciente, otro paciente a parte de la infección desarrollo un tumor que también acabo causándole la muerte. Además, 4(21,05%) de los 19 pacientes con infección tuvieron una evolución negativa y necesitaron tratamiento en este periodo. También se pudo comprobar que 4(5,71%) de los 70 pacientes de LLC incluidos en este estudio desarrollaron cánceres secundarios.

Con el objeto de intentar validar los resultados obtenidos en este estudio y poder predecir la evolución de los pacientes con LLC se realizó un análisis de curvas ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic Curve) (121), en el que se estudió la relación existente entre la capacidad de los Mφ de los pacientes para expresar HLA-DQ y HLA-DR, en respuesta al LPS, y el desarrollo de infecciones bacterianas. En este estudio se quiso establecer un punto de corte que

nos diera la mayor sensibilidad y especificidad posible para predecir la aparición de infecciones en pacientes con LLC teniendo en cuenta la capacidad para expresar HLA-DQ y HLA-DR.



**Fig. R6. Relación entre la expresión en superficie de HLA-DQ y HLA-DR en Mφ con la aparición de infecciones en pacientes con LLC (Curvas ROC).** Análisis mediante curvas ROC que asocian la inducción de la expresión de HLA-DQ (línea punteada) y de HLA-DR (línea continua) con la probabilidad de aparición de infecciones en pacientes con LLC. Para HLA-DQ no hay una asociación significativa, el ABC= 0,7 IC 95% 0,455-0,97; p=0,128). Para HLA-DR sí hay una asociación significativa y presenta un ABC= 0,8 IC 95% (0,5655-1,00) p= 0,040).

Las curvas ROC de HLA-DQ y de HLA-DR (Fig. R6) muestran que la expresión de HLA-DR en Mφes capaz de discriminar entre individuos que vayan a desarrollar o no infecciones. El área bajo la curva de HLA-DR (ABC=0,8; p=0.04) mientras que, para HLA-DQ (ABC= 0,7; p=0,13). Por este motivo, establecimos en la curva de HLA-DR un punto de corte para la inducción de la expresión de esta molécula en Mφ en respuesta al LPS de: 1,05, es decir, aquellos Mφ circulantes de un paciente con LLC que al estimularse con LPS no presente una inducción mayor de 1,05 tiene hasta un 85,7% de probabilidades de desarrollar una infección, puesto que este punto de corte tiene una sensibilidad de 85,7% con un Intervalo de Confianza al 95%, IC95% (42,1-99,5) y una especificidad de 80%, con un IC95% (44,4-97,5). Estos resultados demuestran la importancia de HLA-DR como biomarcador en la LLC y concuerdan con datos previamente publicados en los que se relaciona la elevada frecuencia de MφCD14+/HLA-DR<sup>lo/neg</sup> con un incremento en la carga tumoral y una peor evolución de la LLC (64).



## 4.4 FACTORES SOLUBLES POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL ESTADO DE TE EN M $\phi$ DE PACIENTES CON LLC.

---

Existen numerosos artículos en los que se ha descrito la capacidad de las células tumorales para secretar diversos factores al medio que pueden ejercer un importante efecto modulador sobre aquellas células que rodean al tumor (93; 165). Los M $\phi$ , en presencia de determinados factores, pueden cambiar su fenotipo de respuesta inmune de una respuesta anti-tumoral y pro-inflamatoria hacia una respuesta pro-tumoral y anti-inflamatoria, favoreciendo el desarrollo del tumor y la metástasis (13; 81; 92; 199). Por este motivo, se estudió el efecto de los factores solubles producidos por las células tumorales presentes en el plasma de pacientes sobre M $\phi$  de VS.

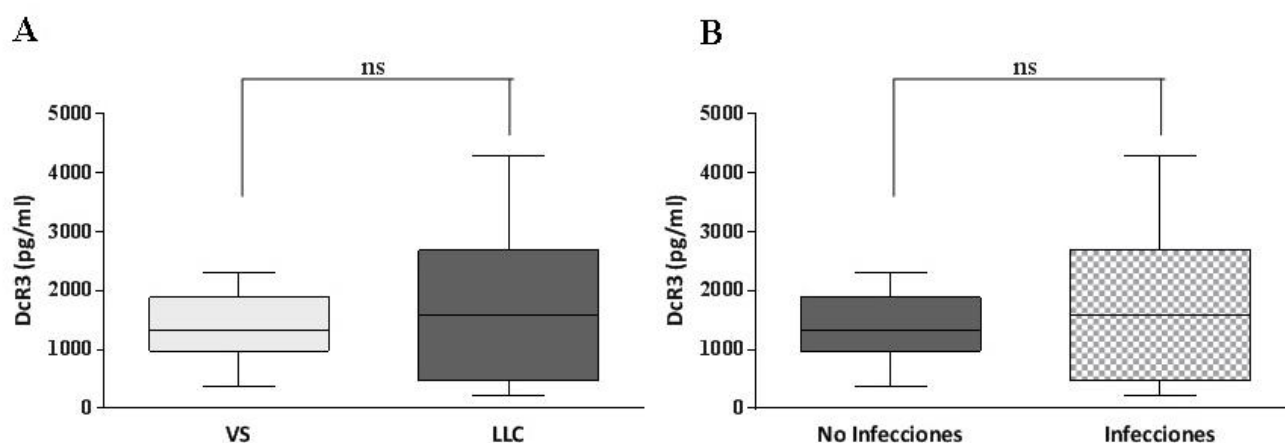
Algunos de los principales factores solubles en los que se ha descrito el papel en el desarrollo de tumores son el Decoy receptor 3(DcR3) y el ácido hialurónico (HA) (102; 167; 173; 183; 198).

### 4.4.1. *Possible implicación de DcR3 y del Ácido Hialurónico en la tolerancia.*

---

La molécula DcR3 se ha descrito como un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF (TNFRSP6B), es un receptor soluble que ha perdido su dominio transmembrana y que posee la capacidad para neutralizar el efecto biológico de 3 importantes citoquinas de la superfamilia TNF: FasL, LIGHT, y TL1A (122; 149; 200). En concreto, DcR3 se ha estudiado en el contexto del cáncer, se ha comprobado que las células tumorales expresan altas cantidades de DcR3 lo que favorece su supervivencia y evita el ataque citotóxico al inhibir la interacción entre FasL y Fas, bloqueando de esta forma la apoptosis (61). Estudios *in vitro*, han demostrado que DcR3 puede conducir a los M $\phi$  hacia un fenotipo alternativamente activado, disminuyendo la expresión de CD14, CD16 y HLA-DR, aumentando la expresión del receptor de manosa (CD206) y disminuyendo su capacidad para secretar citoquinas inflamatorias(31).

Cuando se evaluó la presencia de DcR3 no se encontraron diferencias entre los niveles de DcR3 de pacientes y VS en plasma (Fig. R7A). Tampoco se observó una asociación significativa entre los valores en plasma de DcR3 presentes en los pacientes con LLC que desarrollaron infecciones y los que no (Fig. R7B).

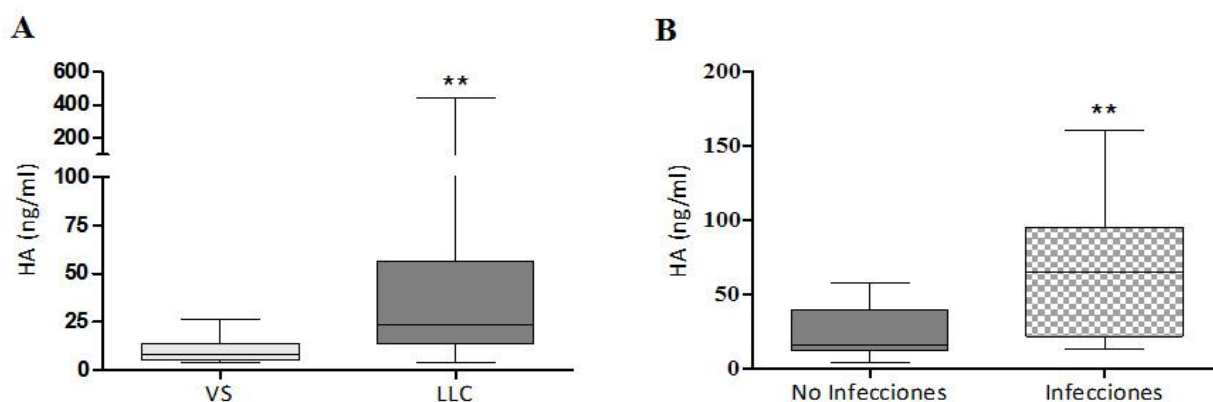


**Fig. R7. Niveles de DcR3 en plasma.**

**(A).** Comparación de los niveles de DcR3 entre los VS y los pacientes con LLC. Niveles de DcR3 (pg/ml) evaluados mediante ELISA, en el plasma de los pacientes con LLC (caja gris oscuro; n=70) y en los VS (caja gris claro; n=19). **(B)** Comparación de los niveles de DcR3 en plasma entre los pacientes con LLC que desarrollan infecciones (Caja gris oscuro) frente a los que no las desarrollan (caja gris claro) en los 60 días posteriores a su inclusión en el estudio. ns=no significativo; análisis mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney tets.

Por otro lado, se decidió cuantificar la cantidad de ácido hialurónico (HA) presente en el plasma de los pacientes con LLC. El HA es un glicosaminoglicano formado por disacáridos repetidos de N-acetil-D-glucosamina y ácido glucurónico, cuyo efecto biológico depende del tamaño del mismo. El HA es sintetizado por tres tipos de HA sintetasas (HAS1, HAS2 y HAS3) y es degradado por una familia de hialorunidasas. Bajo condiciones de homeostasis normales, existe un equilibrio entre la síntesis y la degradación del mismo, que es cuidadosamente regulada para mantener las concentraciones fisiológicas. En estudios previos se ha demostrado que el daño tisular provoca la liberación de diversos componentes de la matriz extracelular entre los que se incluye esta molécula(4). Cuando el ácido hialurónico es degradado en pequeños fragmentos de bajo peso molecular es capaz de activar procesos inflamatorios y subsiguientes estados de tolerancia en distintos tipos celulares, incluyendo los M $\phi$ (35; 134; 161). Por este motivo, se evaluaron en los pacientes con LLC y en VS el nivel de HA en plasma.

Los niveles de HA en el plasma de pacientes con LLC  $M \pm DE$  (68,32 $\pm$ 109,30 ng/ml) son significativamente mayores que en los que se encontraron en los VS  $M \pm DE$  (10,77 $\pm$ 6,74 ng/ml);  $p=0,0007$ . Además cuando se evaluaron los niveles de HA en los pacientes que desarrollaron infecciones se encontraron cantidades en plasma significativamente mayores que en los pacientes que no desarrollan infecciones (67,85 $\pm$ 45,79ng/ml frente a 24,16 $\pm$ 16,58ng/ml;  $p=0.0036$ ) (Figura R8B). Estos resultados indican que existe una asociación entre los niveles de HA en el suero y el desarrollo de infecciones.



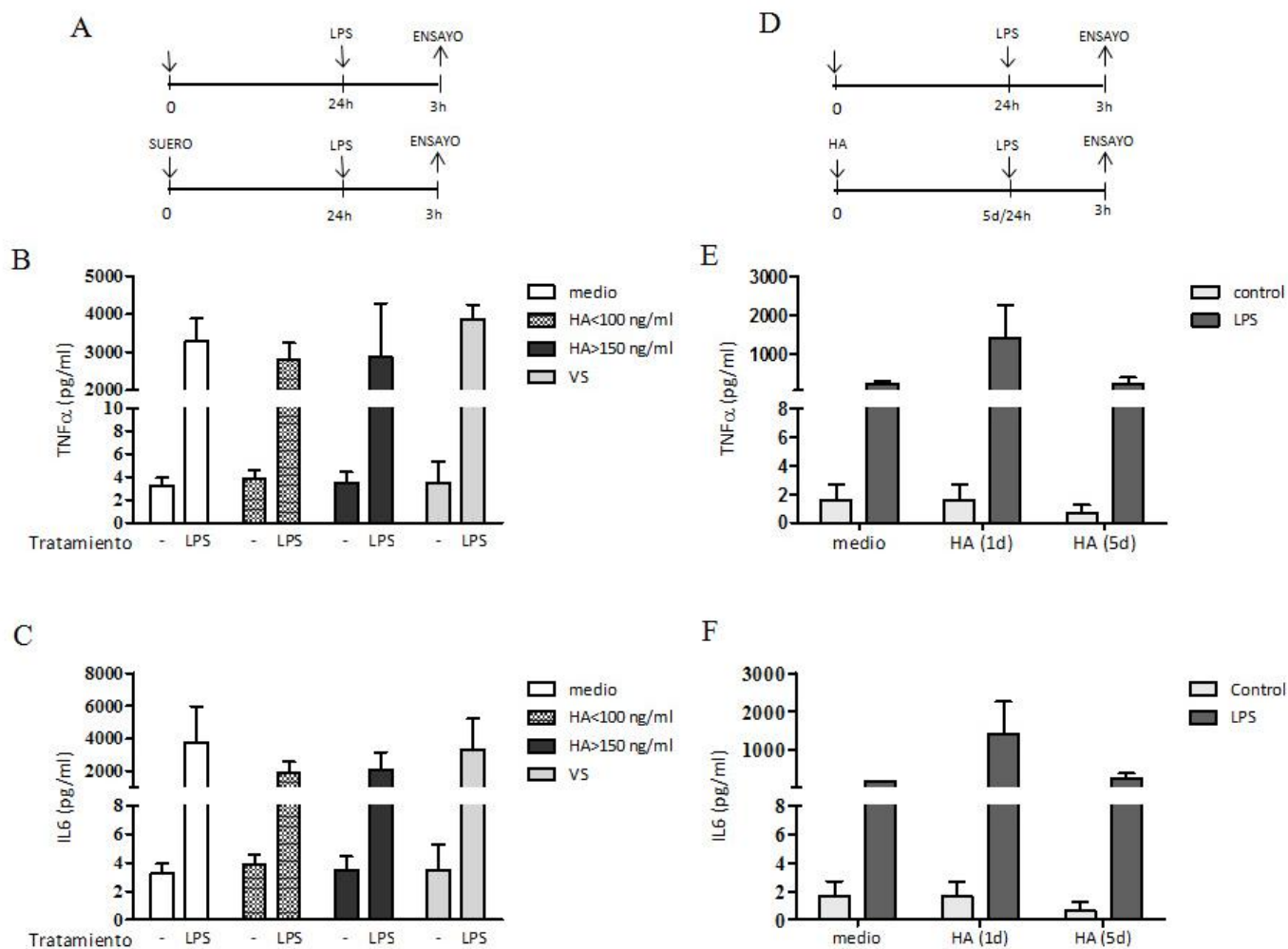
**Fig. R8. Niveles de HA en plasma.**

(A) Los niveles de HA (pg/ml) detectados mediante ELISA en los pacientes con LLC (caja gris oscuro; n=70) son significativamente más elevados que los que se encuentran en los VS (caja gris claro; n=20). (B) Los niveles de HA en los pacientes con LLC cuando se dividen en dos grupos, los que desarrollan infecciones (caja con patrón a cuadros; n=19) y los que no desarrollan infecciones (caja gris; n= 510), se encuentran más elevados en los pacientes que desarrollan infecciones. \*\*\*p<0.001 (Mann-Whitney test).

Para comprobar la implicación del HA en la generación del estado de TE observado en los Mφ de los pacientes con LLC se cultivaron Mφ obtenidos de buffy coats, durante 24 horas, en presencia de medio suplementado al 10% con sueros procedentes de pacientes con LLC. Estos sueros se clasificaron en base a la concentración de HA como sueros con niveles altos (>150ng/ml) y como sueros con niveles bajos (<100ng/ml). Por último, el estado de TE se evaluó midiendo la secreción de TNFα y de IL6 mediante CBA, en respuesta a la estimulación con LPS (10ng/ml) durante 3 horas.

Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias en la secreción de TNFα ni de IL6 entre los Mφ pre-tratados con sueros de pacientes con LLC y los pre-tratados con sueros de los VS. Además, este efecto es independiente de la concentración HA (Fig. R9B y C).

Con el objetivo de comprobar el efecto aislado del HA en la respuesta inflamatoria, Mφ obtenidos de buffy coat se estimularon con HA comercial (R&D Systems, Minneapolis, EEUU), a una concentración de 10ng/ml. Esta estimulación previa se realizó durante 24 horas o durante 5 días. Los resultados obtenidos no muestran ninguna inducción del fenotipo de TE en los Mφ, no se observó disminución alguna en la secreción de TNFα e IL6 (Fig. R9E, F).



**Fig. R9. Implicación del HA en la generación de la TE en Mφ.**

(A) Esquema del modelo experimental utilizado en los siguientes experimentos. Niveles de TNFα(B) y de IL6 (C) secretados por los Mφ, obtenidos de buffy coats, en respuesta al LPS, después de ser cultivados con medio suplementado al 10% con suero de pacientes con niveles de HA<100ng/ml (barras punteadas) o HA>150ng/ml(barras negras) y de VS (barras grises). Los controles son Mφ cultivados en presencia de medio completo y únicamente estimulados con LPS (barras blancas). (D) Diseño experimental utilizado para generar un estado de TE mediante el uso de HA comercial.) Niveles de secreción de TNFα (E) y de IL6 (F) en respuesta a la estimulación con LPS (10ng/ml; 3 horas)(barras grises) después del pre-tratamiento con medio, HA durante 1 día o durante 5 días. En todos los casos existía un incremento significativo de la expresión de TNFα y de IL6 en respuesta al LPS frente a los que no eran estimulados. En cambio, no se observaron diferencias entre los distintos pre-tratamientos. Análisis realizado mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Por otra parte, para valorar otros posibles factores solubles que pudieran estar implicados en la generación de la TE, Mφ obtenidos de buffy coats se cultivaron en presencia de medio suplementado, 50% medio fresco: 10% sobrenadante obtenido del cultivo de los linfocitos (Lφ) de pacientes y de VS, durante 3 días y después s estimularon con LPS. LaEn su conjunto, estos resultados sugieren que los factores solubles estudiados no son los responsables

del estado de tolerancia a endotoxinas que presentan los M $\phi$  de los pacientes con LLC. Aunque sí se encontró una asociación positiva entre la presencia de HA y la LLC. Además de una relación entre el incremento de HA y el desarrollo de infecciones en estos pacientes.

## 4.5 EL CONTACTO CÉLULA-CÉLULA ES NECESARIO PARA GENERAR LA TE EN MONOCITOS.

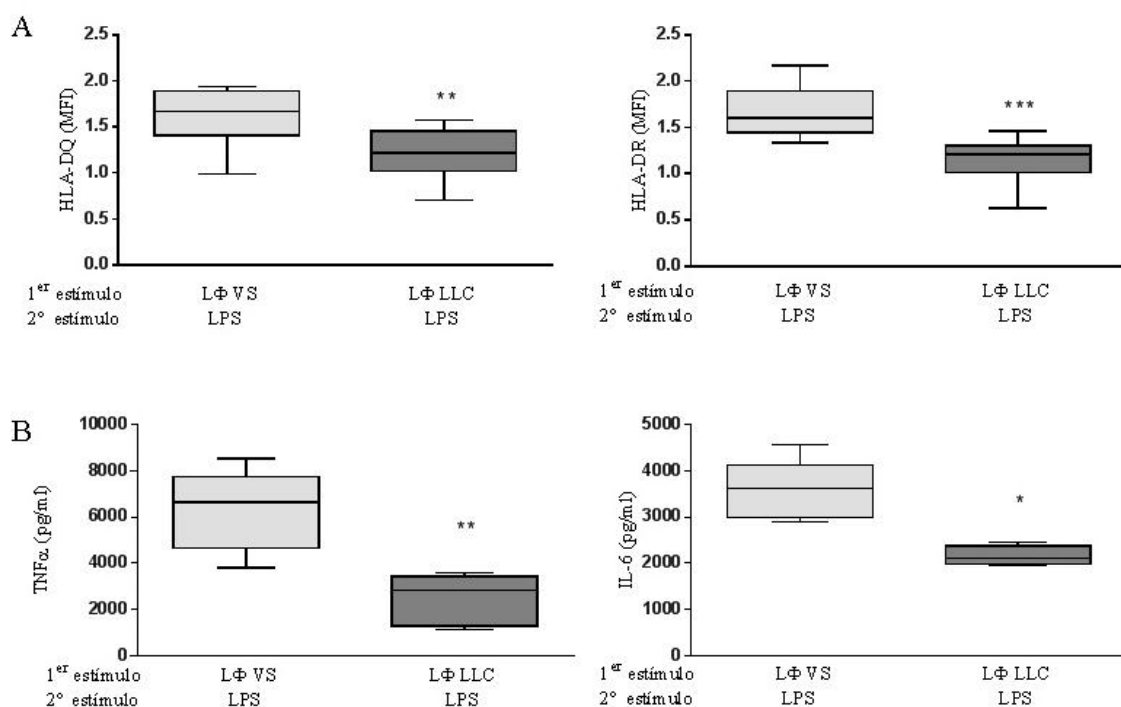
---

Uno de los objetivos de este trabajo es identificar el agente o agentes responsables de generar un estado refractario en los M $\phi$  de los pacientes con LLC. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, *in vitro*, hasta ahora no relacionan el fenotipo de TE descrito en los pacientes con LLC con ninguno de los factores solubles testados (DcR3, HA, factores solubles secretados por los L $\phi$  tumorales). Por este motivo se quiso estudiar si existe la necesidad del contacto célula-célula para la generación del estado refractario.

Para el diseño de estos experimentos se co-cultivaron M $\phi$  naïve, obtenidos de buffy coats, con L $\phi$  procedentes de pacientes con LLC o de VS. Los L $\phi$  utilizados para el co-cultivo con M $\phi$  humanos se obtuvieron del sobrenadante retirado después de realizar la adherencia de los M $\phi$ . El efecto del co-cultivo de los L $\phi$  junto con los M $\phi$  se evaluó exponiendo a estos últimos a un estímulo con LPS (10ng/ml) diferentes tiempos, según lo que se quisiese evaluar.

Los M $\phi$  se sembraron en placas y se co-cultivaron con los L $\phi$  de los pacientes con LLC o de los VS en una relación 1:1 durante 3 días. Pasado el tiempo de co-cultivo, los L $\phi$  se retiraron del medio y los M $\phi$  se estimularon con LPS (10ng/ml) durante 24 horas. Una vez finalizado el tiempo de estimulación se midieron, mediante citometría de flujo, los niveles de expresión de HLA-DQ y de HLA-DR en superficie. Además, parte del sobrenadante de estos cultivos se recogió a las 5 horas de su estimulación con LPS para evaluar la secreción al medio de las citoquinas TNF $\alpha$  e IL6.

Se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de HLA-DQ y de HLA-DR en superficie en aquellos M $\phi$  co-cultivados previamente con L $\phi$  procedentes de pacientes con LLC y estimulados con LPS. Además, cuando se estudió la secreción al medio de TNF $\alpha$  y de IL6 se pudo comprobar que el co-cultivo previo con L $\phi$  de pacientes produce una importante disminución de la secreción de estas dos citoquinas comparada con los M $\phi$  que se co-cultivaron en presencia de los L $\phi$  procedentes de VS (Fig R10B).



**Fig. R10: La pre-exposición a Lφ de LLC induce TE en Mφ naïve.**

**(A)** Niveles de expresión en membrana de HLA-DQ y de HLA-DR en Mφ naïve tratados con LPS (10 ng/ml, 24 horas) después del co-cultivo con Lφ procedentes de pacientes (cajas gris oscuro; n=7) o procedentes de VS (cajas blancas; n=6) en relación 1: 1 durante 3 días **(B)** Secreción de TNFα y de IL6 evaluados mediante CBA en el sobrenadante de los mismo pacientes en los que se evaluó la expresión de HLA-DQ y HLA-DR, después de 5 horas de estimulación con LPS. Los datos muestran la M±DE de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico mediante U de Mann-Whitney; \*p<0.05; \*\*p<0.001 y \*\*\*p<0.0001.

Los resultados obtenidos en los ensayos del co-cultivo con Lφ de pacientes sugieren que el fenotipo tolerante observado en los Mφ de los pacientes con LLC se genera a partir del contacto célula-célula. Con la finalidad de estudiar más en profundidad el proceso de tolerancia, se diseñó un modelo experimental que permitiese ampliar la caracterización de este fenotipo en la LLC.

## 4.6 VÍAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN LA TE OBSERVADA EN LA LLC.

### 4.6.1. Diseño de un modelo *in vitro* de TE.

Con el fin de estudiar en profundidad los procesos intracelulares implicados en la TE se diseñó un modelo *in vitro* que emulase las características observadas en los pacientes con LLC.

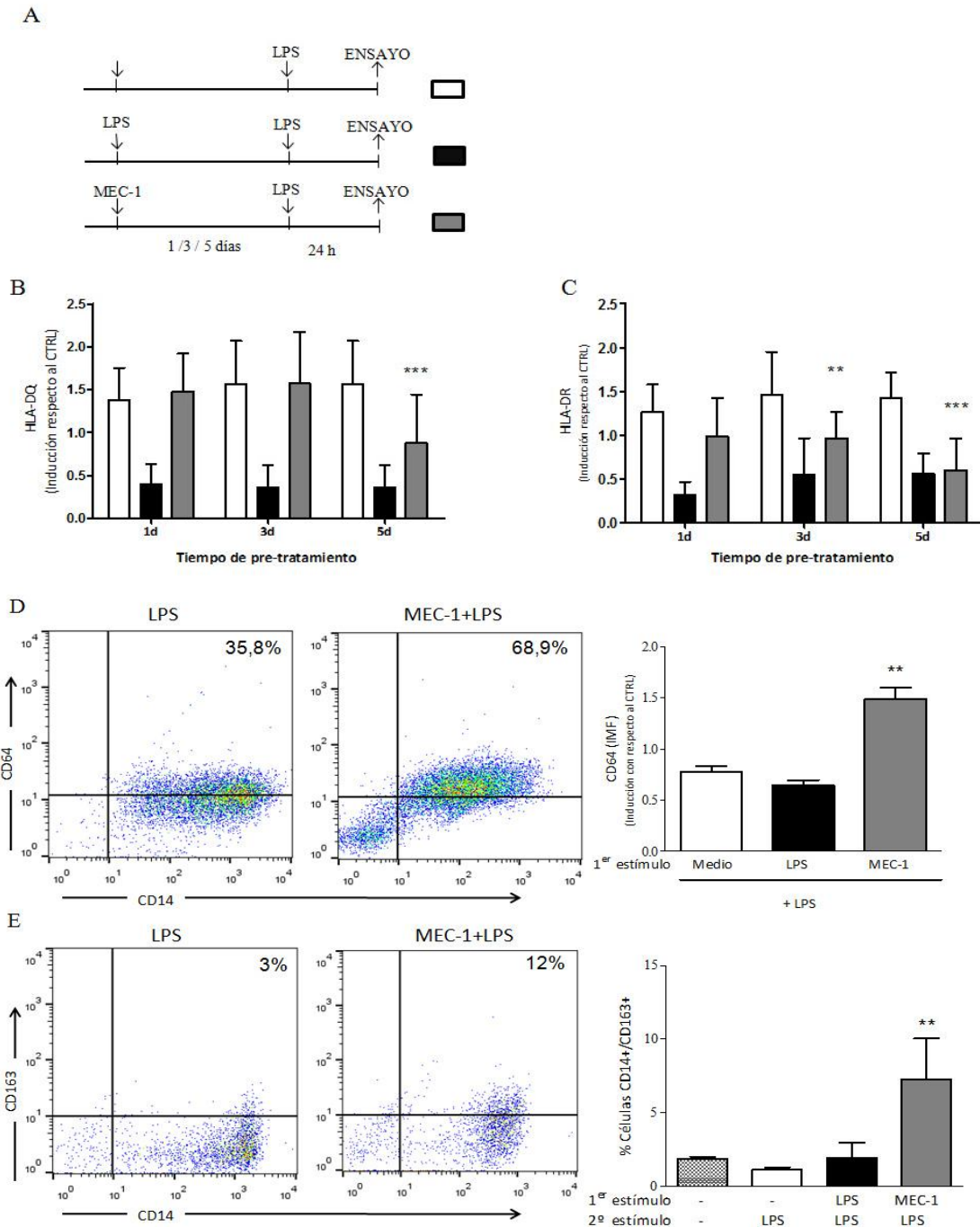
Para ello se tuvieron en cuenta los resultados previos obtenidos en este trabajo, en el que se muestra la necesidad del contacto célula- célula para generar la TE en los Mφ.

Lo primero que se hizo fue establecer las condiciones de co-cultivo, proporción celular y duración del mismo utilizando como guía los modelos desarrollados previamente por nuestro grupo (175). Se realizó una estimulación inicial con células MEC-1 (primer estímulo) en una relación 10 Mφ: 3 células MEC-1, durante 1, 3 y 5 días, con el fin de determinar la duración óptima del co-cultivo necesario para inducir un fenotipo tolerante. Una vez pasado el tiempo de co-cultivo se retiró el medio en el que se encontraban suspendidas las células MEC-1 y los Mφ se re-estimularon con LPS (10ng/ml) durante 3, 6 o 24 horas dependiendo de lo que se quisiera evaluar.

Con el objeto de comprobar la validez del modelo se estudiaron las diferentes características observadas en los Mφ de los pacientes con LLC como los niveles de expresión de HLA-DQ y de HLA-DR en respuesta al LPS (10ng/ml). Se pudo establecer que al menos se necesitan tres días de co-cultivo previo con las células MEC-1 para que se reduzca ligeramente la expresión de HLA-DQ y de HLA-DR. De hecho, los datos obtenidos revelan que con 5 días de co-cultivo con células MEC-1 se produce una reducción significativa de la expresión de ambas moléculas, HLA-DQ y HLA-DR (Fig.R11B y R11C). Por lo tanto establecimos que 5 días de co-cultivo simulan de la mejor manera lo que ocurre a los Mφ de los pacientes con LLC donde existe un contacto célula-célula durante un largo tiempo.

Además, tal y como se muestra en el esquema de los experimentos realizados (Fig.R11A) en todos los ensayos se incluyó una condición control, en el que los Mφ se mantenían en medio de cultivo durante el tiempo de pre-tratamiento recibiendo un único estímulo final con LPS (10 ng/ml). Por otro lado, para corroborar que los Mφ utilizados desarrollaban correctamente el fenotipo de tolerancia, se incluyó una condición en la que los Mφ recibían un pre-tratamiento con LPS (10ng/ml) durante el mismo tiempo del co-cultivo previo y un estímulo final de LPS para revelar el fenotipo tolerante.

Los datos obtenidos de la expresión de HLA-DQ y de HLA-DR están representados como el número de veces que aumenta o disminuye la expresión de estas moléculas con respecto a los niveles de los Mφ que no han recibido pre-estimulación alguna. Una vez establecido el tiempo de co-cultivo necesario para inhibir la sobre-expresión de HLA-DQ y de HLA-DR, se estudiaron otros marcadores de TE, como el receptor Fc-gamma1 (Fcγ1) CD64, descrito como un marcador de fagocitosis en los Mφ (60). Este marcador se observó aumentado significativamente en aquellos Mφ co-cultivados previamente con MEC-1 durante 5 días con respecto la expresión observada en los Mφ tratados únicamente con LPS en el estímulo final (Fig.R11D).



**Fig. R11: Diseño de un modelo de TE in vitro en la LLC.**

(A) Esquema del diseño experimental con el que se han realizado los experimentos. Niveles de expresión en membrana de HLA-DQ (B) y de HLA-DR (C) en Mφ obtenidos de buffy coat, co-cultivados con células MEC-1 (barras grises) durante 1, 3 y 5 días y estimulados posteriormente con LPS (10 ng/ml, 24 horas) (D) Dot blot representativos de la expresión de CD64 en membrana de Mφ estimulados con LPS, sin recibir tratamiento previo (izquierda) o después de co-cultivarse con células MEC-1 (10 Mφ: 3 Células MEC-1; durante 5 días) (dot blot derecha). Representación estadística de la expresión de CD64. (E) Dot blot representativos de la expresión de CD163 en membrana de Mφ estimulados con LPS, sin recibir tratamiento previo (dot blot izquierda) o después de co-cultivarse con células MEC-1 (10 Mφ: 3 Células MEC-1; durante 5 días) (dot blot derecha). Representación estadística de la expresión de CD163. Los datos muestran la M±DE de 6 experimentos independientes. Análisis estadístico mediante U de Mann-Whitney; \*p<0.05; \*\*p<0.001 y \*\*\*p<0.0001.

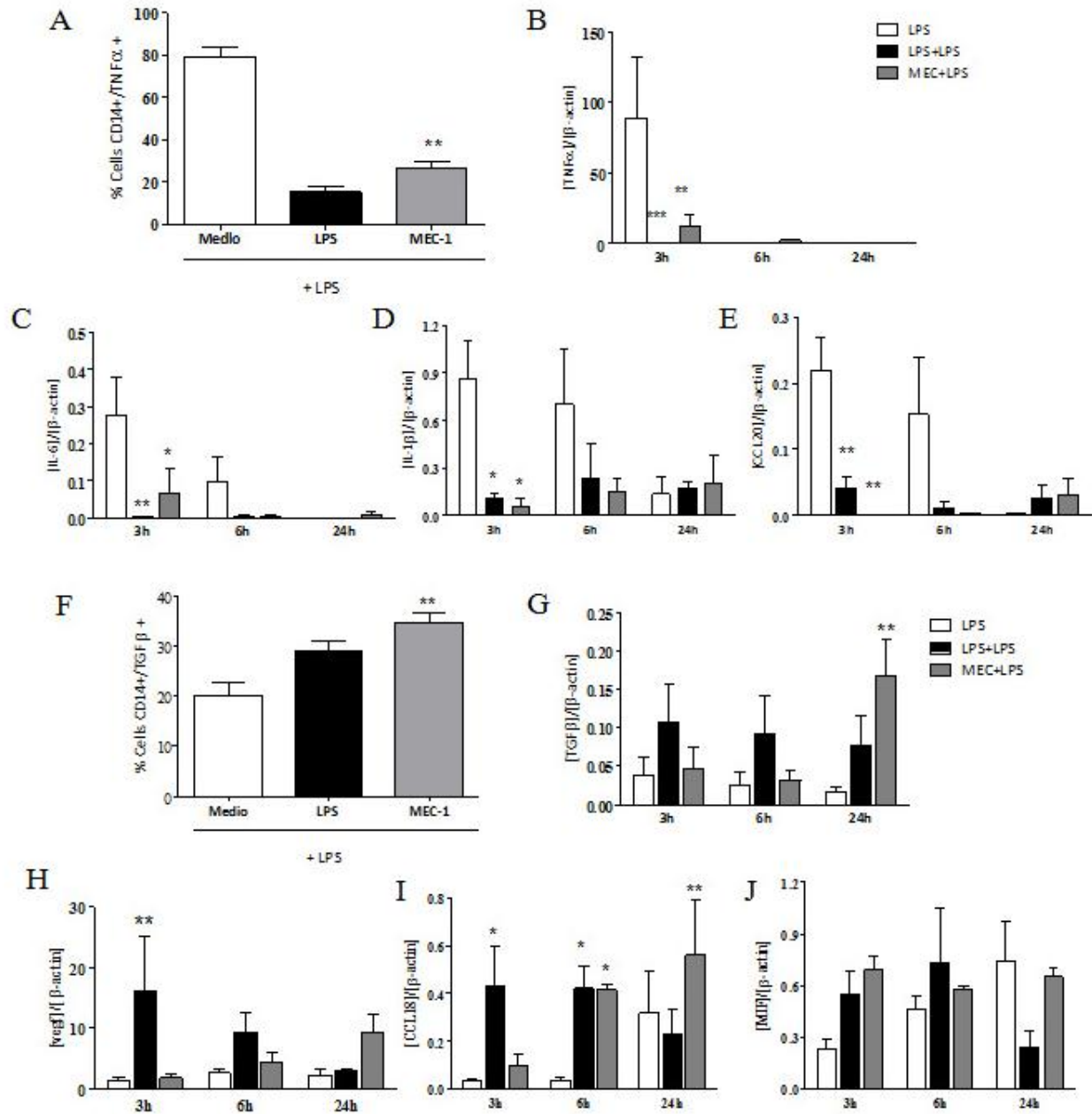


Además se comprobó la expresión del receptor depurador de hemoglobina o scavenger CD163. Se ha demostrado que este receptor se expresa en una subpoblación de Mφ polarizados en respuesta a factores anti-inflamatorios como IL4, IL10 o corticoesteroides (28; 177). En este trabajo también se ha comprobado que los Mφ aislados de los pacientes con LLC presentan una elevada expresión de esta molécula en su superficie celular. En el modelo *in vitro* se observó que los Mφ CD14<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> aumentan su frecuencia de manera significativa, después de ser co-cultivados previamente con células MEC-1 durante 5 días, en comparación con la frecuencia de expresión en aquellos Mφ que no han sido co-cultivados (7,26±6,18 vs 1,86±0,3 respectivamente p=0.008).

#### **4.6.2. Producción de citoquinas inflamatorias en el modelo de TE *in vitro* en LLC.**

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el modelo *in vitro* de TE con células MEC-1 y comprobado que se cumplían las características fenotípicas descritas en los Mφ aislados de los pacientes se quiso estudiar si el perfil de tolerancia a endotoxinas también se daba en la producción de citoquinas inflamatorias. Además, este modelo se utilizó para estudiar con mayor profundidad las moléculas implicadas en este proceso, facilitando aquellos estudios donde las muestras de pacientes podrían resultar limitadas.

En el modelo se evaluó la capacidad de los Mφ co-cultivados previamente con células MEC-1 para secretar citoquinas inflamatorias utilizando citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa en la producción de esta molécula en respuesta al LPS comparada con la expresión observada en aquellas células que únicamente han recibido la estimulación final de LPS; M±DE del porcentaje de células CD14<sup>+</sup>/TNFα<sup>+</sup> (26,33%±7,63%vs 79,17%±10,68%; p=0,0022)(Fig. R12A). Además, los valores de producción de TNFα en los Mφco-cultivados con células MEC-1 son similares a los reducidos niveles observados en el control de TE (LPS 5 días + LPS) con una M±DE (15,25±5,37). Por otra parte, se estudió la cinética de expresión de los diferentes genes inflamatorios a las 3, 6 y 24 horas después del estímulo final con LPS, en Mφ co-cultivados previamente durante 5 días con células MEC-1. La extracción del mRNA se realizó en los Mφ, aislados mediante bolitas magnéticas que seleccionan las células CD14<sup>+</sup> siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos.



**Fig. R12. Citoquinas inflamatorias producidas en Mφ del modelo de TE in vitro en LLC.**

(A) Porcentaje de células CD14+/TNFα+ medido mediante citometría de flujo intracelular. Los Mφ co-cultivados previamente con células MEC-1 (barras grises) frente a los Mφ únicamente estimulados con LPS (barras blancas) secretan menos cantidad de TNFα. (B-E) Expresión del mRNA de citoquinas pro-inflamatorias 3, 6 y 24 horas tras la estimulación con LPS (10ng/ml) en Mφ previamente co-cultivados con células MEC-1 (barras grises), estimulados con LPS (10ng/ml) o en cultivo sin tratamiento durante 5 días (barras blancas). (F) Secreción de TGFβ medida mediante citometría de flujo intracelular donde el porcentaje de células CD14+/TGFβ+ es significativamente mayor en los Mφ co-cultivados previamente con células MEC-1 durante 5 días (barras grises). (G-J) Expresión del mRNA de las citoquinas anti-inflamatorias 3, 6 y 24 horas tras la estimulación con LPS (10ng/ml) en Mφ previamente co-cultivados con células MEC-1 (barras grises), estimulación con LPS (10 ng/ml) o en cultivo sin ningún tratamiento durante 5 días (barras blancas). El análisis estadístico se realizó comparando las células co-cultivadas con MEC-1 durante 5 días (barras grises) frente a los Mφ que sólo se estimularon con LPS (10ng/ml) durante 24 horas (barras blancas). Todos los histogramas están representados como la M± DE de una n=6, ns= no significativo, \* p<0.05, \*\* p<0.01 (Análisis estadístico no paramétrico U de Mann-Witney).

En la figura R12, están representados los niveles de expresión de los genes de TNF $\alpha$  (A), IL1 $\beta$  (B), IL6 (C) y CCL20 (D). Los M $\phi$  únicamente estimulados con LPS presentan una importante sobre-expresión del mRNA de estos genes pro-inflamatorios. En cambio, los M $\phi$ co-cultivados previamente con células MEC-1, durante 5 días, presentaban una significativa disminución en la expresión de estas citoquinas. La quimioquina CCL20, también llamada quimioquina reguladora de la activación del hígado (LARC) o proteína 3-alpha del macrófago inflamatorio (MIP3A), se encuentra sobre-expresada en respuesta al LPS por los M $\phi$ (163), y se ha descrito como un potente quimio-atrayente de linfocitos (72). En el modelo *in vitro*, CCL20 presentan una total reducción de esta quimioquina, en los M $\phi$  co-cultivados con las células MEC-1 y en los M $\phi$  pre-estimulados durante 5 días con LPS.

Además, se evaluaron los niveles de expresión de algunas quimioquinas y moléculas sobre-expresadas por los M $\phi$  tolerantes. La producción de TGF $\beta$  se estudió mediante citometría de flujo en los M $\phi$  co-cultivados con células MEC-1 se encontró un mayor porcentaje de células CD14+/TGF $\beta$  que en los M $\phi$  que sólo recibieron el estímulo final de LPS (M $\pm$ DE 34,73% $\pm$ 4,78% vs 20,17% $\pm$ 6,55%; p=0.0013) (Fig. R12A). También se comprobaron los niveles de expresión del mRNA de los genes TGF $\beta$  (Fig.R12A), VEGF (B), CCL18 (C) y MIF (D). El co-cultivo previo con células MEC-1 durante 5 días aumenta los niveles de expresión de TGF $\beta$ , esta molécula es producida por numerosas células tumorales y por los propios M $\phi$  y contribuye a la metástasis y la progresión del tumor (82; 110).

En el caso del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), descrito como una importante quimioquina en M $\phi$  tolerantes (115), se encuentra sobre-expresado en los M $\phi$  co-cultivados previamente con células MEC-1 frente a los M $\phi$  control, aunque esta diferencia no llega a ser significativa (Fig R16B). Por otra parte, la quimioquina con motivo C-C, CCL18, producida principalmente por los M $\phi$  asociados a tumor, cuya expresión en sangre o en el estroma tumoral, se ha asociado con metástasis y con una reducida supervivencia de los pacientes (32), también se encuentra significativamente aumentada en los M $\phi$  co-cultivados previamente con células MEC-1 frente a aquellos sólo estimulados con LPS (Fig. R16C).

Por último, se analizó el Factor Inhibitorio de Migración de los macrófagos (MIF). Esta quimioquina es capaz de suprimir de manera activa la respuesta anti-tumoral de los linfocitos (1; 201). En los M $\phi$  co-cultivados previamente con células MEC-1 la expresión de MIF se encuentra elevada desde el inicio del estímulo con LPS, aunque no existen diferencias significativas con la expresión obtenida en los M $\phi$  únicamente estimulados con LPS.

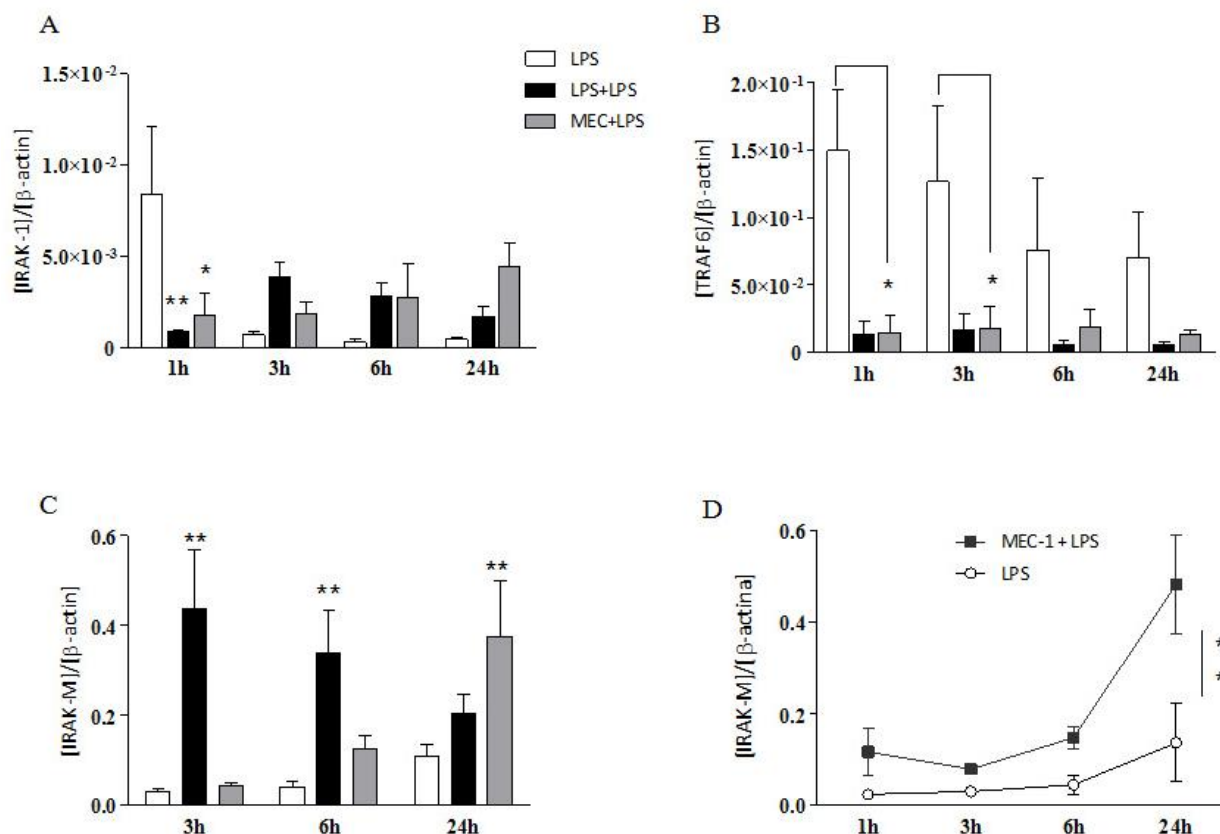
#### **4.6.3. Vías intracelulares implicadas en la TE del modelo in vitro de LLC.**

La activación de TLR4 por el LPS induce la unión a este receptor de diversas proteínas adaptadoras intracelulares como MyD88. Estas proteínas, a su vez, se encargan de reclutar a; IRAK-1, IRAK-4 y TRAF6. Por otro lado, reguladores negativos de la señalización a través de los como IRAK-M, antagonizan la señalización a través de interacciones proteína-proteína previniendo, la subsiguiente activación de IRAK-1 (87). Teniendo en cuenta estos datos se estudiaron los cambios que el co-cultivo con las células MEC-1 podía generar en las moléculas implicadas en la señalización de TLR4. Se analizaron los niveles de expresión del mRNA de IRAK-1, TRAF6 e IRAK-M en Mφ previamente co-cultivados con células MEC-1. Para el desarrollo de estos experimentos los Mφ de Buffy Coat co-cultivados con células MEC-1 durante 5 días, se estimularon con LPS (10ng/ml durante 1, 3, 6 y 24 horas). Antes de la extracción del mRNA los Mφ fueron aislados con bolitas magnéticas CD14, una vez aislados se procesaron tal y como se indica en materiales y métodos para la extracción del mRNA.

La expresión de IRAK-1 se encontró significativamente disminuida en los Mφ co-cultivados con células MEC-1 desde el inicio de la estimulación con LPS (Fig. R13A). La disminución en la expresión de IRAK-1, en un tiempo temprano, impide la señalización a través del TLR4. La expresión de TRAF6, del mismo modo que ocurre con IRAK-1, se encuentra significativamente disminuida en los Mφ co-cultivados previamente con células MEC-1 frente a los Mφ que únicamente recibieron el estímulo del LPS. Esta disminución, igual que para IRAK-1, ocurre desde el inicio de la estimulación con LPS (Fig. R13B).

Al contrario de lo que ocurre en los Mφ estimulados sólo con LPS, la expresión génica de IRAK-M se encuentra regulada positivamente desde el inicio de la estimulación con LPS en aquellos Mφ co-cultivados previamente con células MEC-1, al igual que en los pre-tratados con LPS. En el caso de los Mφ co-cultivados con MEC-1, aunque el aumento de IRAK-M comienza una hora después de recibir el segundo estímulo de LPS, esta diferencia se ve incrementada con el tiempo (Fig. R13C). La presencia de niveles altos de IRAK-M desde el inicio en Mφ co-cultivados previamente con células MEC-1, impide que IRAK-1 y TRAF6 puedan señalizar a través de la cascada inflamatoria.

Los Mφ co-cultivados durante 5 días con las células MEC-1 (línea negra), cuando se estimulan nuevamente con LPS aumentan significativamente sus niveles de IRAK-M desde el inicio. Por el contrario, los Mφ que sólo reciben el último estímulo de LPS (línea blanca), presentan un ligero aumento de la expresión de IRAK-M tan sólo después de 24 horas de estimulación con LPS (10ng/ml) (Fig. R13D).



**Fig. R13. Expresión de IRAK-M en el modelo in vitro de LLC.**

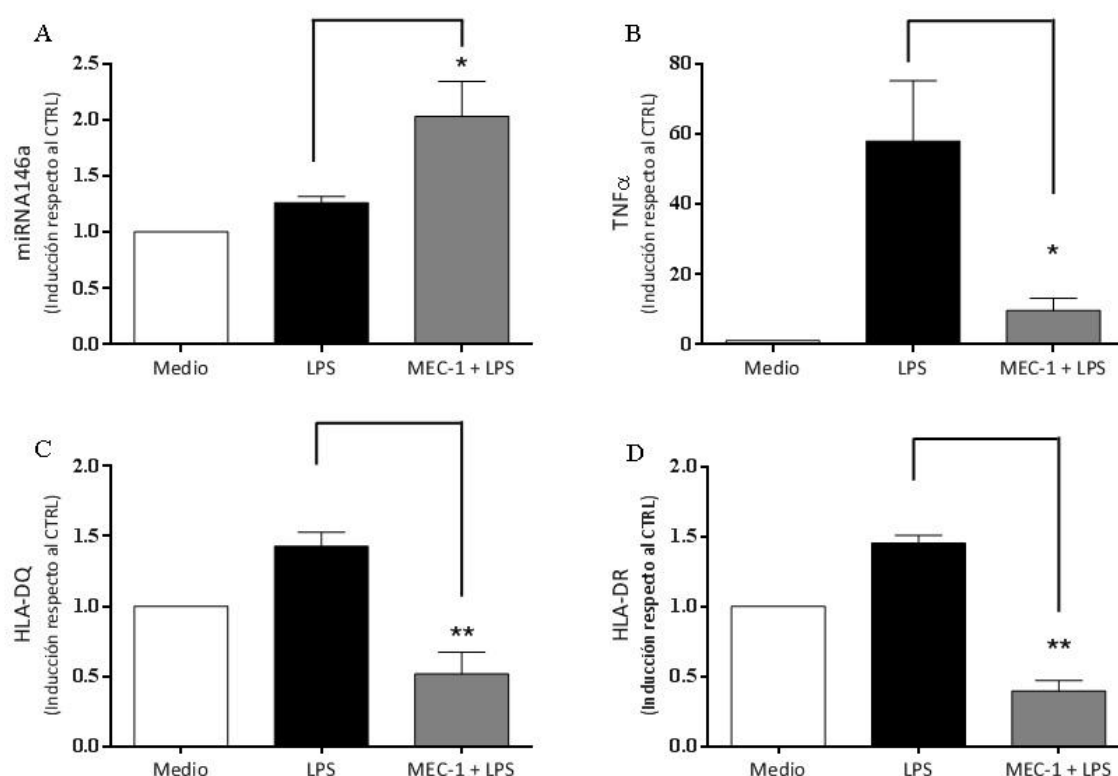
Expresión del mRNA de IRAK-1 (**A**), de TRAF6 (**B**) y de IRAK-M (**C**). Representación de la ( $M \pm DE$ ) de los niveles de expresión de los M $\phi$  en respuesta al LPS (10ng/ml) durante 1, 3, 6 y 24 horas. Los M $\phi$ co-cultivados con células MEC-1 durante 5 días (10 M $\phi$ : 3 MEC-1; barras grises) o estimulados previamente también durante 5 días con LPS (10ng/ml; barras negras). (**D**) Representación de los niveles de expresión de IRAK-M ( $M \pm DE$ ) en los distintos tiempos evaluados (1, 3, 6 y 24 horas) frente a la expresión de IRAK-M en los M $\phi$  que únicamente se estimulan con LPS. Todos los experimentos muestran la  $M \pm DE$  de  $n = 5$  experimentos independientes. En todos los casos las comparaciones estadísticas se realizaron frente a los niveles de expresión de los M $\phi$  únicamente tratados con LPS. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ . Análisis estadístico mediante una Anova, con un post-test no paramétrico Kruskal Wallis.

## 4.7 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR IMPLICADA EN LA TE: PAPEL DEL miRNA146a.

Tal y como referimos en la Introducción, la señalización inflamatoria a través del receptor TLR4 termina con la translocación al núcleo del factor de transcripción NF $\kappa$ B, dando lugar a la expresión de diferentes citoquinas pro-inflamatorias como son el TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL12 (74; 109; 133; 147). Esta señalización está ampliamente regulada, de hecho se ha descrito que tanto la tolerancia a endotoxinas en los M $\phi$  humanos, como en los M $\phi$  de ratón está asociada

con un descenso en la formación del complejo TLR4-MyD88-IRAKs, debido por ejemplo, a una disminución de la actividad de la kinasa IRAK-1 y de la expresión de TRAF6 (25; 77; 98; 148; 179).

Los miRNAs están adquiriendo una gran importancia en la regulación de la respuesta del sistema inmune. Fallos en su regulación se han relacionado con la aparición de enfermedades inflamatorias



**Fig. R14. Expresión del miRNA146a los Mφ del modelo de TE in vitro en LLC.**

(A) Niveles de expresión del miRNA146a en los Mφ aislados de buffy coats estimulados con LPS (10ng/ml) durante 3 horas, después de un co-cultivo previo con células MEC-1 durante 5 días (barra gris) o sin pre-tratamiento (barra negra). La expresión del miRNA146a se normalizó con el RNU24. En cada una de las condiciones se analizó la inducción de la expresión de TNFα (B); la expresión de las moléculas de presentación antigénica HLA-DQ (C) y HLA-DR (D). Todas las gráficas muestran la M±DE de los niveles de inducción tomando como referencia el nivel basal respectivo sin recibir ningún tratamiento. Las comparaciones estadísticas se realizaron frente a los niveles de expresión de los Mφ únicamente estimulados con LPS. \* p<0.05; \*\*p<0.01. Test no paramétrico U de Mann-Whitney.

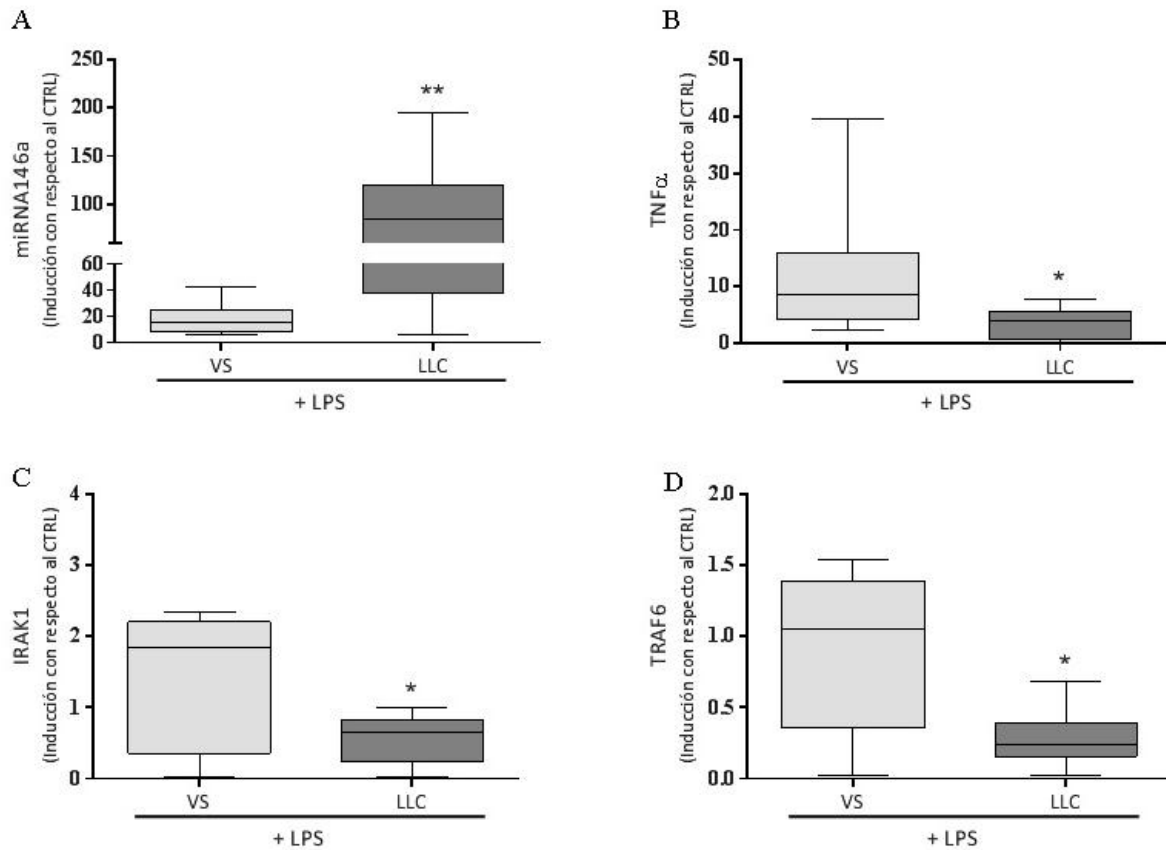
Los miRNAs más estudiados en la activación de los Mφ son el miRNA-155, -146, -147 -9 y -21, todos ellos inducidos por ligandos de los TLRs (138; 141). El miRNA146a se ha relacionado ampliamente con el fenómeno de la TE (135; 152; 179). Además, se ha comprobado como el

aumento de su expresión se mantiene en la células tolerizadas con LPS cuando son estimuladas posteriormente con ligandos de otros TLRs (135). Hasta el momento no hay datos publicados que asocien la TE causada por el contacto con células tumorales y el aumento en la expresión del miRNA146a.

A la luz de los resultados obtenidos en el modelo en las moléculas implicadas en la señalización a través del TLR4 se estudió el nivel de expresión del miRNA146a en el modelo *in vitro*. Este miRNA se encuentra significativamente sobre-expresado en los Mφ co-cultivados previamente con células MEC-1 cuando son estimuladas con LPS. Además, la expresión de TNFα, a nivel de mRNA, también se encuentra significativamente disminuida en estos Mφ. Por otro lado, y para comprobar el fenotipo de TE en los Mφ que se evaluó la expresión del miRNA146a, también se estudiaron los niveles de expresión en membrana de HLA-DQ y HLA-DR (Fig. R14).

Con el objeto de validar los resultados obtenidos en el modelo se comprobó en los Mφ asilados de los pacientes con LLC, la expresión del miRNA146a. Para ello 10 pacientes y 10 VS se estimularon con (10ng/ml) durante 3 horas. Una vez finalizado el tiempo de estimulación se recogieron las células y se aislaron los Mφ mediante bolitas magnéticas que une CD14. Los Mφ purificados se lisaron y el RNA se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Y los niveles de expresión del miRNA146a se comprobaron mediante sondas TaqMan, todos los datos se normalizaron con el miRNA RNU24. El análisis de los resultados muestra un aumento de la expresión del miRNA146a en los Mφ procedentes de los pacientes con LLC frente a los Mφ de VS. La sobre-expresión del miRNA146a está asociada con la generación de un estado de TE en Mφ(43). Además se comprobó el estado tolerante de los Mφ de pacientes evaluando la expresión de TNFα (Fig. R15B), HLA-DR y HLA-DQ tras un estímulo con LPS.

Por otro lado, también se analizaron los niveles de expresión de IRAK-1 y de TRAF6, descritos como dianas directas del miRNA146a (25; 98; 148; 179). La expresión de estos dos genes se encontró significativamente disminuida en los Mφ de pacientes con LLC (Fig. R15C y D).



**Fig. R15. Expresión del miRNA146a y sus genes dianas IRAK-1, TRAF6 en pacientes con LLC.**

(A) Niveles de expresión del miRNA146a en los M $\phi$  aislados de VS (cajas gris claro; n=10) frente a los M $\phi$  aislados de los pacientes con LLC (cajas gris oscuro; n=10) después de su estimulación con LPS (10ng/ml) durante 3 horas. (B) Representación de los niveles de inducción de TNF $\alpha$  en los mismos pacientes en los que se evaluó la expresión de miRNA, M $\phi$  procedentes de los pacientes con LLC frente a los VS. Expresión del mRNA de los genes diana del miRNA146a, IRAK-1 (C) y TRAF6 (D). Todos los experimentos muestran la M $\pm$ DE de los niveles de inducción de los distintos RNAs (LLC n= 10; VS n=10). Se han representado tomando como referencia los niveles basales de cada uno de los individuos sin estimular. Las comparaciones estadísticas se realizaron frente a los niveles de expresión de los M $\phi$  aislados de los VS. \* p<0.05; (t-test no paramétrico/Mann-Whitney)

Este último resultado sugiere que el fenotipo que presentan los M $\phi$  aislados de los pacientes con LLC, se corresponde con un fenotipo de tolerancia a endotoxinas, y que es un proceso que puede encontrarse controlado por el miRNA146a, al igual que ocurre en la TE causada por el LPS (86; 135). Además, las dianas directas descritas para este miRNA presentan una expresión disminuida, así como la producción de las citoquinas inflamatorias como el TNF $\alpha$ , que se encuentra en su cascada de señalización.



## ***5. DISCUSIÓN***



Tal y como hemos expuesto en la introducción, la Leucemia Linfática Crónica es una enfermedad oncológica, que se desarrolla lentamente y que puede no requerir de tratamiento durante meses e incluso años. Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con LLC son las infecciones recurrentes. Alrededor del 80% de los pacientes con LLC presentan alguna complicación infecciosa a lo largo del transcurso de la enfermedad. Además, se ha estimado que el 60% de las muertes de los pacientes con LLC se deben a las infecciones y sus complicaciones (75; 124; 128; 154).

A pesar de que un número importante de trabajos indican la existencia de una conexión entre la alta frecuencia de infecciones y la hipogammaglobulinemia en pacientes de LLC (124; 154; 157) existe un grupo de pacientes que, aún presentando una producción estándar de Igs, padecen infecciones oportunistas (ver tabla 2 resultados). En nuestra cohorte la mayoría de pacientes que desarrollaron infecciones, el 63,2%, no presentaban niveles bajos de inmunoglobulinas. Por lo tanto no podemos afirmar que la causa del incremento en la tasa de infecciones sea únicamente debido a la hipogammaglobulinemia. Por otra parte, se ha descrito que los bajos niveles de inmunoglobulinas suelen presentarse en estadios avanzados de la enfermedad (178). Sin embargo, de los 70 pacientes reclutados en nuestro estudio, el 80% (60 pacientes) se encontraban en un estadio Binet A, siendo este el estadio inicial de la enfermedad (18).

Los M $\phi$  de los pacientes con LLC analizados para este trabajo no generaron una respuesta inflamatoria clásica tras la estimulación *ex vivo* con endotoxina (LPS). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que estos M $\phi$  secretan significativamente menos TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  en respuesta al LPS en comparación con los M $\phi$  de VS. El mismo resultado se observó para la expresión de TNF $\alpha$  mediante tinción intracelular. Por el contrario, la IL8, a pesar de que se ha descrito como una citoquina pro-inflamatoria, debido a su capacidad quimioatrayente sobre los neutrófilos y sus propiedades inflamatorias (11), se secreta en grandes concentraciones por los M $\phi$  de pacientes cuando se exponen al LPS. Este resultado no es contradictorio en un fenotipo tolerante puesto que también se ha descrito como un importante factor angiogénico en varios tipos de cánceres y se ha asociado con metástasis (38; 106; 171; 186).

Por otro lado la IL10, conocida por ser una importante citoquina anti-inflamatoria (34), también mostró una disminución tras la estimulación. En este contexto, la expresión y la regulación de la IL10 parecen tener un papel contradictorio. Por una parte, varios autores han demostrado el importante papel que juega la IL10 en el control de la tolerancia a endotoxinas (120; 196). Mientras que otros trabajos han descrito un débil efecto en la generación de la

tolerancia a endotoxinas para esta citoquina (131), no siendo suficiente para explicar el proceso de desregulación observado en los pacientes sépticos (116). Además, experimentos realizados en ratones knockout para la IL10 demostraron que estos desarrollaron un fenotipo tolerante cuando se exponían en dos ocasiones sucesivas al LPS (17). Otra importante molécula anti-inflamatoria analizada mediante citometría de flujo, TGF $\beta$ , presentó un ligero incremento de expresión en los M $\phi$  de los pacientes con LLC frente a los VS, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Al igual que se ha descrito por otros autores, nuestra cohorte de pacientes mostró un incremento significativo de la población no-clásica de monocitos, en concreto un 35,4% de ellos presentaban un perfil CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> (160; 174)(figura R3A). Siendo el aumento de la población no clásica un claro indicio de la presencia de M $\phi$  con un fenotipo tolerante. Estos M $\phi$  no-clásicos pueden estar implicados en el aumento de la tasa de infecciones de los pacientes con LLC puesto que en la literatura se relaciona la presencia de M $\phi$  CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> con un estado de tolerancia a endotoxinas en sepsis (4; 26) y una baja producción intracelular de TNF $\alpha$  (41). La expresión del marcador CD16 también se ha asociado con la capacidad para inducir reguladores negativos de la vía TLR4/MyD88 como IRAK-M, o el antagonista del receptor de la IL1 (IL1-RA) en pacientes con sepsis causada por Gram-negativas (164).

En el estudio de la caracterización completa del fenotipo de los M $\phi$  circulantes en pacientes con LLC se analizó la expresión del marcador de superficie CD163. Esta molécula se encuentra presente en un mayor número de monocitos en los pacientes que en los VS. Sin embargo, las diferencias no llegan a ser significativas debido a la gran dispersión y variabilidad entre muestras (Fig. R3C). Este marcador se ha utilizado en diferentes estudios como parámetro para discriminar M $\phi$  con perfil tolerante(59; 89; 104), asociándose positivamente con estadios más avanzados del cáncer, un mayor tamaño y comportamientos más agresivos del mismo (118; 190).

Por otro lado, el marcador CD64, ampliamente relacionado con la capacidad fagocítica de los M $\phi$  (60), presentó un significativo incremento de su expresión en los M $\phi$  procedentes de los pacientes con LLC frente a los M $\phi$  de los VS. En línea con estos resultados, la capacidad fagocítica de bacterias Gram negativas (E. Coli) por los M $\phi$  de pacientes también se encontró incrementada de manera significativa (Fig. R4). Otros grupos de investigación también han demostrado que M $\phi$  humanos en un estado TE aumentan su capacidad para internalizar los patógenos presentando, al mismo tiempo, una pérdida de la presentación antigénica de los mismos (133).

Además de las características fenotípicas anteriores, una menor capacidad en la presentación antigénica ha sido descrita en los Mφ tolerantes (60; 74). En nuestra de cohorte de pacientes se observó una significativa disminución de la expresión de las moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase II, HLA-DQ y HLA-DR, del mismo modo que presentan una baja capacidad para la presentación antigénica (Fig. R5).

A modo de resumen, podemos destacar que las principales características encontradas en los Mφ de los pacientes con LLC son:

- Incapacidad para secreción de citoquinas inflamatorias
- Incremento de la población no-clásica de Mφ (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>)
- Sobreexpresión de CD64 y de CD163
- Incremento de la fagocitosis
- Escasa expresión de HLA-DQ y HLA-DR
- Baja presentación antigénica.

Estos hallazgos indican la existencia de un estado refractario en estos pacientes. Y podemos inferir que el riesgo inherente a infecciones oportunistas en pacientes de LLC no se encuentra asociado ni con el tratamiento, ni con el fenómeno de la hipogammaglobulinemia. En este sentido, no encontramos una relación clara entre la disminución de las inmunoglobulinas y la incidencia de infecciones. Como se resume en la Tabla R2, el 63% de los pacientes que padecieron una infección dentro de los 60 días posteriores a la inclusión en nuestro estudio, mostraron tener unos niveles normales de inmunoglobulinas. Este resultado nos indica que los Mφ pueden estar implicados en este fenómeno.

Tal y como hemos afirmado anteriormente, una característica relevante observada en los Mφ de pacientes con LLC estudiados es la baja expresión en superficie de las moléculas, HLA-DQ y HLA-DR. Es por ello que se realizó un análisis de curvas ROC con la finalidad de comprobar la posible relación de estos marcadores y la aparición de infecciones en los pacientes. Los resultados obtenidos demuestran que existe una relación inversa entre los niveles de expresión de HLA-DQ y HLA-DR y el aumento de la tasa de infecciones en estos pacientes. En este trabajo

se ha corroborado la importancia de la molécula HLA-DR en la LLC para predecir posibles complicaciones de la patología. Hasta ahora se había descrito una relación entre la presencia de un mayor número de CD14<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>lo/neg</sup> en pacientes con LLC y una disminución en el tiempo de progresión de esta enfermedad, acortando el periodo que permanecen sin tratamiento ni complicación alguna(64), pero no con la aparición de infecciones. Por este motivo, los resultados obtenidos sugieren un papel importante para este marcador de expresión en superficie como predictor del riesgo de infecciones en estos pacientes.

La mayoría de los trabajos asocian la TE a un contacto previo con alguna endotoxina, lo cual induce un estado refractario durante la segunda exposición a la misma (37; 200). Sin embargo, estímulos de distinta naturaleza pueden inducir TE, por ejemplo, nuestro grupo ha descrito este fenómeno en patologías “estériles”, como el infarto de miocardio, en cuyos pacientes el DNA mitocondrial liberado al plasma induce un notorio estado refractario en el sistema inmune (52).

En el presente trabajo, se demuestra un estado de TE en monocitos de pacientes de LLC causados por el contacto con las células tumorales. Nuestros ensayos *in vitro* indican que los Mφ de los VS son reprogramados a un estado de TE después de co-cultivarse con linfocitos obtenidos de los pacientes con LLC. A pesar de que se ha descrito que los microambientes tumorales son capaces de regular la actividad funcional de los monocitos (92; 180), no se pudo demostrar la existencia de un factor o factores solubles en el suero de los pacientes capaz de inducir este estado refractario en Mφ. El cultivo de los monocitos de VS con medio suplementado con el 10% de suero de pacientes con niveles altos de HA o con el HA *per sé*, no indujo un claro fenotipo tolerante. Estos últimos resultados contradicen la correlación encontrada entre los niveles del ácido hialurónico y la aparición de infecciones en pacientes con LLC. Otro importante factor soluble descrito como modulador de la respuesta inmune en los Mφ, el Decoy Receptor 3 (DcR3)(31) fue analizado, pero los resultados observados no muestran diferencias en la cantidad de DcR3 presente en suero de los pacientes comparado con los niveles presentes en el suero de los VS. Además, tampoco se encontró correlación entre los niveles de DcR3 y la aparición de infecciones en los pacientes (Fig. R7).

Debido a que ninguno de los factores solubles estudiados, DcR3 y HA, son moléculas capaces de inducir un estado TE en Mφ en condiciones *in vitro*, se diseñó un modelo que simulase las características observadas en los pacientes con LLC. Teniendo en cuenta que para obtener un fenotipo de TE es necesario el contacto célula-célula. Los resultados obtenidos

demostraron que para generar el estado de TE en M $\phi$  de buffy coat, usando la línea celular de leucemia linfática MEC-1, era necesario un co-cultivo previo de 5 días.

Una de las herramientas utilizadas para la validación del modelo *in vitro* fue la expresión en superficie de HLA-DQ y de HLA-DR en M $\phi$ . Una vez establecidas las condiciones óptimas del modelo, se validaron los diferentes resultados obtenidos en los ensayos de los M $\phi$  aislados de los pacientes con LLC. Como el marcador CD64, CD163, la secreción de TNF $\alpha$  y de TGF $\beta$ . Por otro lado, se evaluaron los niveles de expresión del mRNA de diferentes citoquinas descritas como pro-inflamatorias, TNF $\alpha$ , IL6, IL-1 $\beta$  y CCL20 (115; 163). En todos los casos encontramos una disminución en la expresión en M $\phi$  previamente co-cultivados con células MEC-1 en comparación con aquellos sólo expuestos al LPS. Además, cuando se evaluaron las principales citoquinas y quimioquinas descritas como características de un perfil tolerante, TGF $\beta$  (110), VEGF (115), CCL18 (32) y MIF (1) se observó un incremento significativo de los niveles de expresión de su mRNA en los M $\phi$  co-cultivados previamente con las células MEC-1 frente a aquellos estimulados únicamente con LPS.

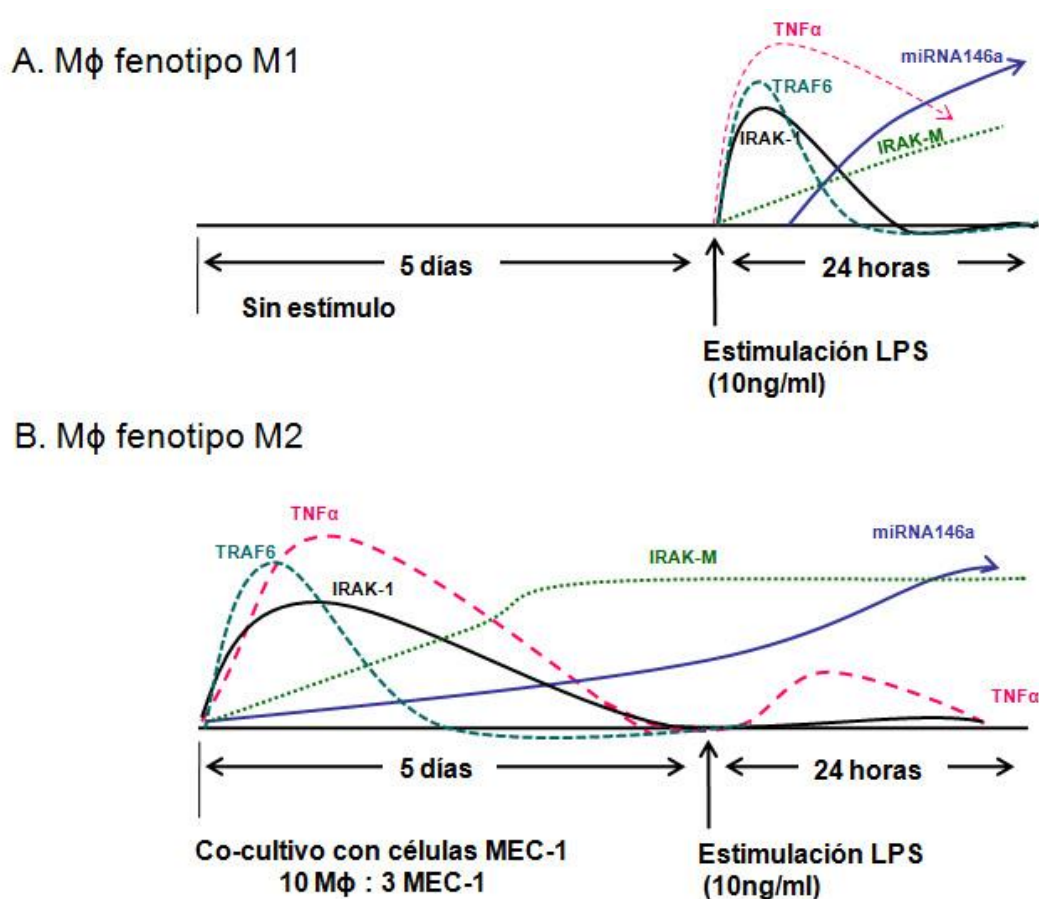
La pseudokinasa IRAK-M se ha descrito como un miembro de la familia IRAK implicada en la tolerancia a endotoxinas (46; 87; 136). En trabajos previos de nuestro grupo se reportó que la IRAK-M se sobre-expresa de manera rápida en M $\phi$  que presentan TE cuando se exponen al LPS y en M $\phi$  circulantes aislados de pacientes con sepsis (46). También se ha visto como la estimulación previa con las células tumorales, A431 y HeLa, incapacita a los M $\phi$  para responder de manera inflamatoria frente a un nuevo estímulo tumoral, aumentando la expresión de IRAK-M e impidiendo la señalización a través de la ruta del TLR4 (175). Cuando se comprobaron los posibles efectos del co-cultivo con las células MEC-1 en la expresión de diferentes genes de la cascada del TLR4 se observó la disminución de la expresión de IRAK-1 y TRAF-6 y el aumento de IRAK-M. El fenotipo de los M $\phi$  del modelo *in vitro* de LLC es muy similar al fenotipo observado en los M $\phi$  aislados de los paciente con LLC.

Por su parte, los miRNAs tienen un destacado papel en la regulación post-transcripcional (14), numerosos artículos describen su influencia en la señalización de la respuesta inmune (12; 22; 138; 142). Debido a este hecho y con el objetivo de acercarnos al mecanismo que subyace en la TE desarrollada por estos pacientes con LLC estudiamos la presencia de miRNAs con actividad descrita en procesos de TE. Se pudo comprobar que tanto los M $\phi$  procedentes de buffy coats co-cultivados previamente con las células MEC-1, como los M $\phi$  aislados de pacientes con LLC expresan niveles significativamente altos de miRNA146a en respuesta al LPS. Este microRNA ha sido identificado por jugar un papel crucial en la tolerancia inducida por endotoxina (98; 135;

148; 179). En este sentido, Shao et al. (166) demostró la asociación existente entre el gen de miRNA146a y sepsis severa en 226 pacientes.

En la presente tesis doctoral, se ha comprobado que la expresión de este miRNA aumenta en Mφ estimulados con LPS tras el contacto con células tumorales. De hecho, los Mφ de los pacientes con LLC expuestos *ex vivo* a LPS, incrementaron sus niveles de miRNA146a entre 2 a 200 veces con respecto al nivel basal. Sin embargo, en los monocitos de voluntarios sanos no observamos este efecto.

Fig. D1. Esquema de las moléculas implicadas y la cinética en la respuesta inflamatoria de los Mφ M1 y M2 en el modelo de TE en LLC propuesto en este trabajo.





En concordancia con estos resultados, la expresión de los genes diana del miRNA146a, (TNF $\alpha$ , IRAK-1 y TRAF6), disminuyeron también en los monocitos de pacientes con LLC estimulados con LPS. La regulación negativa de estos factores podría explicar la limitada respuesta inflamatoria observada después de la exposición a endotoxina, en la Fig. D1 se muestra un esquema de la propuesta de regulación implicada en la TE de la LLC. Cabe destacar que resultados similares se obtuvieron en ensayos *in vitro* (Fig. R14). Según los conocimientos acumulados al escribir este manuscrito, esta es la primera vez que se describe una tolerancia-cruzada entre tumor y endotoxinas. En conjunto, nuestros datos indican que los pacientes que sufren de LLC se encuentran en un estado refractario, el cual les impide generar una respuesta inflamatoria clásica frente a patógenos, independientemente de sus niveles de Inmunoglobulinas.

Como resultado del contacto directo entre tumor y monocitos, estos últimos “reprograman” su respuesta innata y expresan altos niveles del miRNA146a, que a su vez, puede regular los niveles de factores críticos en la respuesta inflamatoria como son IRAK-1 y TRAF6. Estos datos proporcionan una nueva explicación del riesgo de infección en enfermos de LLC.



## ***6. CONCLUSIONES***



1. Se ha demostrado que los monocitos circulantes aislados de los pacientes con LLC presentan un fenotipo de activación alternativo frente a patógenos, similar al descrito en la tolerancia a endotoxinas. Este fenotipo tolerante afecta tanto en su capacidad para la secreción de citoquinas, como en la expresión de diferentes marcadores de membrana y en sus capacidades funcionales.

2. Se ha relacionado la expresión de la molécula de histocompatibilidad de clase II, HLA-DR con la evolución y el desarrollo de infecciones.

3. Se ha diseñado un modelo *in vitro* capaz de reproducir las principales características de la TE que presentan los monocitos de los pacientes con LLC, facilitando de esta manera el estudio de los mismos.

4. El modelo de TE en LLC presenta alterada la vía de señalización a través del receptor TLR4 en respuesta al LPS.

5. La pseudoquinasa IRAK-M se encuentra sobre-expresada.

6. El miRNA 146a se encuentra sobre-expresado en los pacientes con LLC en respuesta al LPS. Este miRNA, también presenta expresión incrementada en el modelo de TE de LLC, después del co-cultivo de los M $\phi$  con las células tumorales, MEC-1.

7. En conjunto todos los datos aportados por este trabajo indican que los pacientes con LLC se encuentran en un estado de tolerancia a endotoxinas, causándoles incapacidad para responder de una manera pro-inflamatoria a un estímulo patogénico, independientemente de los niveles de inmunoglobulinas. Debido al contacto directo establecido entre las células tumorales y los M $\phi$ , se produce una reprogramación de su respuesta inmune innata orquestada por la presencia de altos niveles del microRNA146a, el cual regula los niveles de factores críticos en la respuesta inflamatoria, como IRAK-1 y TRAF6. Estos datos aportan una importante explicación para el aumento de riesgo de infecciones en los pacientes con leucemia linfática crónica.



## 7. *BIBLIOGRAFÍA*

---





1. Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. 2001. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* 166:747-53
2. Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, Aymerich M, Gine E, et al. 2009. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood* 114:2044-50
3. Adair-Kirk TL, Senior RM. 2008. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40:1101-10
4. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, Gattolliat O, Beyaert R, Cavaillon JM. 2006. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Critical care medicine* 34:2377-85
5. Akira S. 2006. TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology* 311:1-16
6. Akira S, Takeda K. 2004. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *Comptes rendus biologies* 327:581-9
7. Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, Salvado MT, Sanchez L, et al. 2006. The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. *Haematologica* 91:1605-12
8. Andreu P, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, et al. 2010. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer cell* 17:121-34
9. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, et al. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317:666-70
10. Baan J, Jr., Chang PC, Vermeij P, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. 1996. Effects of losartan on vasoconstrictor responses to angiotensin II in the forearm vascular bed of healthy volunteers. *Cardiovascular research* 32:973-9
11. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 84:1045-9
12. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. 2008. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology* 9:839-45
13. Banerjee S, Lin CF, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, et al. 2011. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. In *Cancer research*, pp. 318-27
14. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-97
15. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, et al. 2009. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5282-7
16. Beigel R, Siegel RJ, Kahlon RS, Jilaihawi H, Cheng W, Makkar RR. 2014. Transcatheter aortic valve implantation for a failed bio-bentall in patients with Marfan syndrome. *Cardiology* 128:9-12
17. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, et al. 1995. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *The Journal of clinical investigation* 96:2339-47
18. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, et al. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198-206
19. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. 2013. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in immunopathology* 35:585-600

20. Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, Del Fresno C, et al. 2007. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol* 179:4083-92
21. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, et al. 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107:2112-22
22. Biswas SK, Lopez-Collazo E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology* 30:475-87
23. Biswas SK, Mantovani A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* 11:889-96
24. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. 2008. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 180:2011-7
25. Biswas SK, Tergaonkar V. 2007. Myeloid differentiation factor 88-independent Toll-like receptor pathway: Sustaining inflammation or promoting tolerance? *The international journal of biochemistry & cell biology* 39:1582-92
26. Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreessen R, Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle-Rowson G. 1997. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 8:73-5
27. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, et al. 2004. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology* 5:1052-60
28. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. 2000. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of leukocyte biology* 67:97-103
29. Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-55
30. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. 2006. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 10:233
31. Chang YC, Hsu TL, Lin HH, Chio CC, Chiu AW, et al. 2004. Modulation of macrophage differentiation and activation by decoy receptor 3. *Journal of leukocyte biology* 75:486-94
32. Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, Su S, et al. 2011. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer cell* 19:541-55
33. del Fresno C, Garcia-Rio F, Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Fernandez-Ruiz I, et al. 2009. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* 182:6494-507
34. del Fresno C, Gomez-Pina V, Lores V, Soares-Schanoski A, Fernandez-Ruiz I, et al. 2008. Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. *PloS one* 3:e2667
35. del Fresno C, Otero K, Gomez-Garcia L, Gonzalez-Leon MC, Soler-Ranger L, et al. 2005. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *J Immunol* 174:3032-40
36. del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gomez-Pina V, Gonzalez-Leon MC, et al. 2007. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *Journal of endotoxin research* 13:39-52
37. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, Zeng X, Kobayashi K, et al. 2006. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *The Journal of clinical investigation* 116:2532-42
38. Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. 1997. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte

- activation, chemotaxis, and angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* 186:1201-12
39. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, et al. 2003. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol* 170:508-19
  40. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4:903-14
  41. Dominguez-Nieto A, Zentella A, Moreno J, Ventura JL, Pedraza S, Velazquez JR. 2014. Human endotoxin tolerance is associated with enrichment of the CD14+ CD16+ monocyte subset. *Immunobiology*
  42. Draisma A, Pickkers P, Bouw MP, van der Hoeven JG. 2009. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Critical care medicine* 37:1261-7
  43. El Gazzar M, Church A, Liu T, McCall CE. 2011. MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF-alpha during TLR4-induced gene reprogramming. *Journal of leukocyte biology* 90:509-19
  44. Engels BM, Hutvagner G. 2006. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25:6163-9
  45. Englund MC, Karlsson AL, Wiklund O, Bondjers G, Ohlsson BG. 2001. 25-hydroxycholesterol induces lipopolysaccharide-tolerance and decreases a lipopolysaccharide-induced TNF-alpha secretion in macrophages. *Atherosclerosis* 158:61-71
  46. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, Valles G, Lendinez MJ, et al. 2003. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochemical and biophysical research communications* 311:465-72
  47. Fernandez-Ruiz I, Arnalich F, Cubillos-Zapata C, Hernandez-Jimenez E, Moreno-Gonzalez R, et al. 2014. Mitochondrial DAMPs Induce Endotoxin Tolerance in Human Monocytes: An Observation in Patients with Myocardial Infarction. *PloS one* 9:e95073
  48. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, et al. 2007. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:2546-53
  49. Foa R, Catovsky D, Brozovic M, Marsh G, Ooyirilangkumaran T, et al. 1979. Clinical staging and immunological findings in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 44:483-7
  50. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. 2007. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447:972-8
  51. Foster SL, Medzhitov R. 2009. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 130:7-15
  52. Francis S, Karanth M, Pratt G, Starczynski J, Hooper L, et al. 2006. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 107:1023-33
  53. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & therapeutics* 100:171-94
  54. Fujiwara N, Kobayashi K. 2005. Macrophages in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy* 4:281-6
  55. Gantier MP, Sadler AJ, Williams BR. 2007. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunology and cell biology* 85:458-62
  56. Ghia P, ten Boekel E, Sanz E, de la Hera A, Rolink A, Melchers F. 1996. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses

- of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *The Journal of experimental medicine* 184:2217-29
57. Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. 2004. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood* 104:1850-4
  58. Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Rodriguez-Rojas A, Del Fresno C, Garcia F, et al. 2007. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* 179:4065-73
  59. Gordon S, Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593-604
  60. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M, Bzowska M, Skrzeczynska J, Pryjma J. 2000. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology* 202:42-50
  61. Green DR. 1998. Apoptosis. Death deceiver. *Nature* 396:629-30
  62. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, et al. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432:235-40
  63. Grigoropoulos NF, Petter R, Van 't Veer MB, Scott MA, Follows GA. 2013. Leukaemia update. Part 1: diagnosis and management. *BMJ* 346:f1660
  64. Gustafson MP, Abraham RS, Lin Y, Wu W, Gastineau DA, et al. 2012. Association of an increased frequency of CD14+ HLA-DR lo/neg monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *British journal of haematology* 156:674-6
  65. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, et al. 2008. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine* 205:1261-8
  66. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, et al. 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111:5446-56
  67. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74
  68. Hansson GK, Edfeldt K. 2005. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:1085-7
  69. Hao S, Baltimore D. 2009. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nature immunology* 10:281-8
  70. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. 2003. Immunologic monitoring. *Immunological reviews* 196:247-64
  71. Herold T, Jurinovic V, Mulaw M, Seiler T, Dufour A, et al. 2011. Expression analysis of genes located in the minimally deleted regions of 13q14 and 11q22-23 in chronic lymphocytic leukemia-unexpected expression pattern of the RHO GTPase activator ARHGAP20. *Genes, chromosomes & cancer* 50:546-58
  72. Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, et al. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *The Journal of biological chemistry* 272:5846-53
  73. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. 2013. Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 62:1439-51
  74. Ioan-Facsinay A, de Kimpe SJ, Hellwig SM, van Lent PL, Hofhuis FM, et al. 2002. FcgammaRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 16:391-402

75. Itala M, Helenius H, Nikoskelainen J, Remes K. 1992. Infections and serum IgG levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 48:266-70
76. Iwasaki A, Medzhitov R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-5
77. Jain HV, Meyer-Hermann M. 2011. The molecular basis of synergism between carboplatin and ABT-737 therapy targeting ovarian carcinomas. *Cancer research* 71:705-15
78. Janeway CA, Jr. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology today* 13:11-6
79. Johnson RW, Nguyen MP, Padalecki SS, Grubbs BG, Merkel AR, et al. 2011. TGF-beta promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. *Cancer research* 71:822-31
80. Karin M, Lawrence T, Nizet V. 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124:823-35
81. Kim HR, Wheeler MA, Wilson CM, Iida J, Eng D, et al. 2004. Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44. *Cancer research* 64:4569-76
82. Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, et al. 1995. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 155:2240-7
83. Kim VN, Han J, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10:126-39
84. Kim WK, Sun Y, Do H, Autissier P, Halpern EF, et al. 2010. Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage. *Journal of leukocyte biology* 87:557-67
85. Kim YG, Park JH, Daignault S, Fukase K, Nunez G. 2008. Cross-tolerization between Nod1 and Nod2 signaling results in reduced refractoriness to bacterial infection in Nod2-deficient macrophages. *J Immunol* 181:4340-6
86. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, et al. 2001. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *The Journal of experimental medicine* 194:1625-38
87. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110:191-202
88. Kobayashi KS, Flavell RA. 2004. Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *Journal of leukocyte biology* 75:428-33
89. Komohara Y, Niino D, Saito Y, Ohnishi K, Horlad H, et al. 2013. Clinical significance of CD163(+) tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer science* 104:945-51
90. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. 2007. Toll-like receptor signal transduction. *Experimental & molecular medicine* 39:421-38
91. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, et al. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198-201
92. Kuang DM, Wu Y, Chen N, Cheng J, Zhuang SM, Zheng L. 2007. Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. *Blood* 110:587-95
93. Lee E, Pandey NB, Popel AS. 2015. Crosstalk between cancer cells and blood endothelial and lymphatic endothelial cells in tumour and organ microenvironment. *Expert reviews in molecular medicine* 17:e3
94. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, et al. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-9

95. Lee Y, Chittiezath M, Andre V, Zhao H, Poidinger M, et al. 2012. Protumoral role of monocytes in human B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: involvement of the chemokine CXCL10. *Blood* 119:227-37
96. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. 2001. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 166:5161-7
97. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20
98. Li CH, Wang JH, Redmond HP. 2006. Bacterial lipoprotein-induced self-tolerance and cross-tolerance to LPS are associated with reduced IRAK-1 expression and MyD88-IRAK complex formation. *Journal of leukocyte biology* 79:867-75
99. Li L, Cousart S, Hu J, McCall CE. 2000. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *The Journal of biological chemistry* 275:23340-5
100. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature reviews. Immunology* 5:446-58
101. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of experimental medicine* 193:727-40
102. Lin WW, Hsieh SL. 2011. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochemical pharmacology* 81:838-47
103. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, Gastineau DA, Witzig TE, Dietz AB. 2011. Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 117:872-81
104. Liu Y, Fan L, Wang Y, Li P, Zhu J, et al. 2014. Tumor-associated macrophages promote tumor cell proliferation in nasopharyngeal NK/T-cell lymphoma. *International journal of clinical and experimental pathology* 7:5429-35
105. Liu YY, Lee CH, Dedaj R, Zhao H, Mrabat H, et al. 2008. High-molecular-weight hyaluronan--a possible new treatment for sepsis-induced lung injury: a preclinical study in mechanically ventilated rats. *Crit Care* 12:R102
106. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. 1997. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *The American journal of pathology* 151:1105-13
107. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* 117:175-84
108. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, et al. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154:5071-9
109. Machino K, Link CD, Wang S, Murakami H, Murakami S. 2014. A semi-automated motion-tracking analysis of locomotion speed in the *C. elegans* transgenics overexpressing beta-amyloid in neurons. *Frontiers in genetics* 5:202
110. Maeda H, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shiraishi A. 1995. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J Immunol* 155:4926-32
111. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Bertoncelli L, Martinelli S, et al. 2013. The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica* 98:1115-23
112. Mages J, Dietrich H, Lang R. 2007. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. *Immunobiology* 212:723-37

113. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* 229:176-85
114. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25:677-86
115. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23:549-55
116. Marie C, Fitting C, Muret J, Payen D, Cavaillon JM. 2000. Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 12:55-61
117. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:453-61
118. Medrek C, Ponten F, Jirstrom K, Leandersson K. 2012. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 12:306
119. Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-26
120. Mendes ME, Baggio-Zappia GL, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Rapozo MM, Salomao R. 2011. Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 216:285-95
121. Mertens D, Philippen A, Ruppel M, Allegra D, Bhattacharya N, et al. 2009. Chronic lymphocytic leukemia and 13q14: miRs and more. *Leukemia & lymphoma* 50:502-5
122. Migone TS, Zhang J, Luo X, Zhuang L, Chen C, et al. 2002. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* 16:479-92
123. Moestrup SK, Moller HJ. 2004. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Annals of medicine* 36:347-54
124. Molica S, Levato D, Levato L. 1993. Infections in chronic lymphocytic leukemia. Analysis of incidence as a function of length of follow-up. *Haematologica* 78:374-7
125. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, et al. 2004. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunology letters* 95:193-8
126. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. 2008. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 14:64-78
127. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol* 23:145-53
128. Morrison VA. 1998. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology* 25:98-106
129. Mosmann TR, Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* 17:138-46
130. Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8:958-69
131. Murphey ED, Sherwood ER. 2006. Bacterial clearance and mortality are not improved by a combination of IL-10 neutralization and IFN-gamma administration in a murine model of post-CLP immunosuppression. *Shock* 26:417-24
132. Mussai F, De Santo C, Abu-Dayyeh I, Booth S, Quek L, et al. 2013. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood* 122:749-58
133. Muthukuru M, Cutler CW. 2008. Antigen capture of *Porphyromonas gingivalis* by human macrophages is enhanced but killing and antigen presentation are reduced by endotoxin tolerance. *Infection and immunity* 76:477-85

134. Muto J, Yamasaki K, Taylor KR, Gallo RL. 2009. Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS. *Molecular immunology* 47:449-56
135. Nahid MA, Satoh M, Chan EK. 2011. Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *J Immunol* 186:1723-34
136. Nakayama K, Okugawa S, Yanagimoto S, Kitazawa T, Tsukada K, et al. 2004. Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 279:6629-34
137. Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology* 8:34-47
138. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. 2010. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 10:111-22
139. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:1604-9
140. O'Neill LA, Bowie AG. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 7:353-64
141. O'Neill LA, Dinarello CA. 2000. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology today* 21:206-9
142. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. 2011. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 11:163-75
143. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, et al. 2004. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 363:105-11
144. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mougin B, Monneret G. 2006. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunology letters* 106:63-71
145. Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN, Siakantaris MP, Kontopidou FN, Angelopoulou MK. 2002. B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematological oncology* 20:103-46
146. Park JK, Han BK, Park JA, Woo YJ, Kim SY, et al. 2014. CD70-expressing CD4 T cells produce IFN-γ and IL-17 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 53:1896-900
147. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. 2008. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1β-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* 180:5689-98
148. Perry MM, Williams AE, Tsitsiou E, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. 2009. Divergent intracellular pathways regulate interleukin-1β-induced miR-146a and miR-146b expression and chemokine release in human alveolar epithelial cells. *FEBS letters* 583:3349-55
149. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, et al. 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396:699-703
150. Puccetti P, Belladonna ML, Grohmann U. 2002. Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Critical reviews in immunology* 22:373-90
151. Qian BZ, Pollard JW. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141:39-51
152. Quinn EM, Wang JH, O'Callaghan G, Redmond HP. 2013. MicroRNA-146a is upregulated by and negatively regulates TLR2 signaling. *PloS one* 8:e62232
153. Rai KR, Montserrat E. 1987. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology* 24:252-6



154. Ravandi F, O'Brien S. 2006. Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 55:197-209
155. Rollinghoff M. 1997. Immunity, components of the immune system and immune response. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 25:165-8
156. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, et al. 2001. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine* 194:1639-47
157. Rozman C, Montserrat E. 1995. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 333:1052-7
158. Sabattini E, Bacci F, Sagrmoso C, Pileri SA. 2010. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica* 102:83-7
159. Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, et al. 2006. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer research* 66:11432-40
160. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. 1999. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:748-53
161. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. 2006. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 177:1272-81
162. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, Haase D, Kulle B, et al. 2005. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 19:750-8
163. Schutyser E, Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Conings R, et al. 2000. Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells. *J Immunol* 165:4470-7
164. Shalova IN, Kajiji T, Lim JY, Gomez-Pina V, Fernandez-Ruiz I, et al. 2012. CD16 regulates TRIF-dependent TLR4 response in human monocytes and their subsets. *J Immunol* 188:3584-93
165. Shan Y, He X, Song W, Han D, Niu J, Wang J. 2015. Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *International journal of clinical and experimental medicine* 8:9114-20
166. Shao Y, Li J, Cai Y, Xie Y, Ma G, et al. 2014. The functional polymorphisms of miR-146a are associated with susceptibility to severe sepsis in the Chinese population. *Mediators of inflammation* 2014:916202
167. Sheikh MS, Fornace AJ, Jr. 2000. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* 14:1509-13
168. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology* 18:385-405
169. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, et al. 2000. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 164:762-7
170. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 64:9-29
171. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. 1994. Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer research* 54:3242-7
172. Sinisalo M, Aittoniemi J, Koski T, Tobin G, Thunberg U, et al. 2004. Similar humoral immunity parameters in chronic lymphocytic leukemia patients independent of VH gene mutation status. *Leukemia & lymphoma* 45:2451-4

173. Sironen RK, Tammi M, Tammi R, Auvinen PK, Anttila M, Kosma VM. 2011. Hyaluronan in human malignancies. *Experimental cell research* 317:383-91
174. Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. 2002. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scandinavian journal of immunology* 55:629-38
175. Soares-Schanoski A, Jurado T, Cordoba R, Siliceo M, Fresno CD, et al. 2012. Impaired antigen presentation and potent phagocytic activity identifying tumor-tolerant human monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 423:331-7
176. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. 1992. Interleukin 4 potentially enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 176:287-92
177. Sulahian TH, Hogger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, et al. 2000. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine* 12:1312-21
178. Svensson T, Hoglund M, Cherif H. 2013. Clinical significance of serum immunoglobulin G subclass deficiency in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Scandinavian journal of infectious diseases* 45:537-42
179. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12481-6
180. Tai SK, Chang HC, Lan KL, Lee CT, Yang CY, et al. 2012. Decoy receptor 3 enhances tumor progression via induction of tumor-associated macrophages. *J Immunol* 188:2464-71
181. Takeda K, Akira S. 2001. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 6:733-42
182. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, et al. 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 179:5082-9
183. Toole BP, Wight TN, Tammi MI. 2002. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *The Journal of biological chemistry* 277:4593-6
184. Torroella-Kouri M, Ma X, Perry G, Ivanova M, Cejas PJ, et al. 2005. Diminished expression of transcription factors nuclear factor kappaB and CCAAT/enhancer binding protein underlies a novel tumor evasion mechanism affecting macrophages of mammary tumor-bearing mice. *Cancer research* 65:10578-84
185. Tosi MF. 2005. Innate immune responses to infection. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116:241-9; quiz 50
186. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. 1994. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *Journal of gastroenterology* 29:423-9
187. van 't Veer C, van den Pangaart PS, van Zoelen MA, de Kruif M, Birjmohun RS, et al. 2007. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J Immunol* 179:7110-20
188. Vuk-Pavlovic S, Bulur PA, Lin Y, Qin R, Szumlanski CL, et al. 2010. Immunosuppressive CD14+HLA-DRIow/- monocytes in prostate cancer. *The Prostate* 70:443-55
189. Wadhwa PD, Morrison VA. 2006. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology* 33:240-9
190. Wang S, Sun M, Gu C, Wang X, Chen D, et al. 2014. Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: mutual relationships and prognostic implications. *European journal of oral sciences* 122:202-9
191. West AP, Koblansky AA, Ghosh S. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology* 22:409-37

192. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11:228-34
193. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. 2000. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 96:218-23
194. Wollina U, Graefe T, Feldrappe S, Andre S, Wasano K, et al. 2002. Galectin fingerprinting by immuno- and lectin histochemistry in cutaneous lymphoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 128:103-10
195. Wu W, Gu J, Ma L, Wang H, Ni J, et al. 2012. [Evaluation of fluorescence in situ hybridization value in detection of chronic lymphocytic leukemia]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* 20:1095-8
196. Wysocka M, Robertson S, Riemann H, Caamano J, Hunter C, et al. 2001. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol* 166:7504-13
197. Xie Q, Gan L, Wang J, Wilson I, Li L. 2007. Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. *Molecular immunology* 44:3453-61
198. Yabushita H, Noguchi M, Kishida T, Fusano K, Noguchi Y, et al. 2004. Hyaluronan synthase expression in ovarian cancer. *Oncology reports* 12:739-43
199. Yasuda T. 2007. Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF-kappaB via ICAM-1. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 56:246-53
200. Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. 1999. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 274:13733-6
201. Zhou Q, Yan X, Gershan J, Orentas RJ, Johnson BD. 2008. Expression of macrophage migration inhibitory factor by neuroblastoma leads to the inhibition of antitumor T cell reactivity in vivo. *J Immunol* 181:1877-86



## 8. *ANEXOS*

---